



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in:
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

**IDENTIFICAZIONE DI UN NUOVO INIBITORE TIROSIN-
CHINASICO PER SUPERARE I FENOMENI DI FARMACO
RESISTENZA ASSOCIATI A EGFR MUTATO NEL
CARCINOMA POLMONARE**

**IDENTIFICATION OF A NOVEL TYROSINE KINASE
INHIBITOR TO OVERCOME DRUG RESISTANCE
ASSOCIATED WITH MUTATED EGFR IN LUNG CANCER**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Marina Petroselli

Relatore: Chiar.ma
Prof.ssa Cristina Minelli

Correlatore: Chiar.ma
Prof.ssa Giovanna Mobbili

Sessione Autunnale
Anno Accademico 2023/2024

SOMMARIO

INTRODUZIONE	4
STRUTTURA DELL'EGFR E MECCANISMO DI ATTIVAZIONE	7
1.1 Struttura dell'EGFR.....	7
1.2 Ligandi dell'EGFR	9
1.3 Meccanismo di attivazione e possibili pathway.....	10
1.3.1 RAS-RAF-MEK-ERK	12
1.3.2 PI3K-AKT-mTOR	13
1.4 Riconoscimento e legame dell'ATP.....	16
PRINCIPALI MUTAZIONI DELL'EGFR COINVOLTE NEL NSCLC E NELLA FARMACO-RESISTENZA	18
2.1 Mutazioni attivanti.....	18
2.2 Mutazioni di resistenza.....	20
TERAPIA A BERSAGLIO MOLECOLARE: EVOLUZIONE DEGLI INIBITORI TIROSIN-CHINASICI (TKIs) NELLA TERAPIA PER IL NSCLC.....	22
3.1 Gli inibitori tirosin-chinasici (TKIs).....	22
3.2 Prima generazione di TKIs	23
3.3 Seconda generazione di TKIs.....	24
3.4 Terza generazione di TKIs.....	25
3.5 Quarta generazione di TKIs.....	26
I FLAVONI: UN PROMETTENTE SCAFFOLD CHIMICO PER LO SVILUPPO DI TKIs	30
4.1 Struttura, caratteristiche, e proprietà dei flavoni.....	30
4.2 Proprietà antitumorali dei flavoni	31
4.3 I flavoni come scaffold efficace per lo sviluppo di TKIs selettivi per le forme mutate di EGFR	32

MATERIALI E METODI	36
5.1 Sintesi e caratterizzazione.....	36
5.1.1 Sintesi di (E)-1-(2-idrossi-5-metil-3-nitrofenil)-3-(3-fenossifenil)prop-2-en-1-one (3a)	37
5.1.2 Sintesi di 6-metil-8-nitro-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-4-one (4a)	38
5.1.3 Sintesi di 8-ammino-6-metil-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-4-one (5a).....	39
5.1.4 Sintesi di N-(6-metil-4-osso-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-8-il)acrilammide (6a, FL30).....	40
5.1.5 Sintesi di N-(6-metil-4-osso-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-8-il)pivalammide (6b, FL33).....	41
5.1.6 Sintesi di N-(6-metil-4-osso-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-8-il)benzammide (6c, FL32).....	42
5.1.7 Sintesi di N-(6-metil-4-osso-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-8-il)propionammide (6e, FL29).....	43
5.1.8 Sintesi di 1-(2-idrossi-5-metossi-3-nitrofenil)etanone (1b)	44
5.1.9 Sintesi di (E)-1-(2-idrossi-5-metossi-3-nitrofenil)-3-(3-fenossifenil)prop-2-en-1-one (3b)	45
5.1.10 Sintesi di 6-metossi-8-nitro-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-4-one (4b)	46
5.1.11 Sintesi di 8-ammino-6-metossi-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-one (5b).....	47
5.1.12 Sintesi di N-(6-metil-4-osso-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-8-il)acrilammide (6d, FL31).....	48
5.2 Saggio di inibizione enzimatica	49
5.3 Colture cellulari.....	50
5.4 Studio della tossicità mediante saggio XTT	51
5.5 Citometria a flusso	52
RISULTATI E DISCUSSIONE	54
6.1 Progettazione di nuovi TKIs utilizzando come scaffold il nitroflavone FL4.....	54

6.2 Sintesi di derivati di flavoni contenenti ammidi e valutazione della loro efficacia mutante-selettiva.....	62
6.2.1 Sintesi di derivati.....	62
6.2.2 Valutazione dell'efficacia mediante saggio di inibizione enzimatica.....	68
6.3 Inibizione reversibile e competitiva di EGFR da parte di FL30: approfondimenti meccanici e sperimentali	70
6.4 Esperimenti cellulari e valutazione della percentuale di fosforilazione	72
CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	78
BIBLIOGRAFIA	79

INTRODUZIONE

Il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) è una proteina transmembrana normalmente espressa sulla superficie della maggior parte delle cellule e coinvolta in importanti processi cellulari tra cui proliferazione, differenziazione e inibizione dell'apoptosi. Il verificarsi di mutazioni nel recettore è spesso correlato all'insorgenza di diverse forme tumorali, tra cui il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC). Particolarmente rilevanti sono le mutazioni a carico del dominio tirosin-chinasico in corrispondenza della tasca di legame dell'ATP le quali spesso inducono l'attivazione costitutiva del recettore, anche in assenza dello specifico ligando. Una delle principali strategie terapeutiche per il trattamento di NSCLC positivo alle mutazioni nel gene EGFR prevede l'utilizzo di inibitori tirosin-chinasici (TKIs): piccole molecole in grado di interagire selettivamente con il recettore mutato inibendone l'attivazione. Negli ultimi anni sono stati individuati ed approvati diversi TKIs basati su un meccanismo reversibile; tuttavia, trattamenti ripetuti con questi farmaci hanno causato l'instaurarsi di mutazioni di resistenza nel gene EGFR. Una delle forme di resistenza più studiate presenta la doppia mutazione L858R/T790M (LT-EGFR). Lo sviluppo di una nuova generazione di TKIs irreversibili, come l'Osimertinib, basati sul legame covalente con il residuo C797 all'interno della tasca di legame dell'ATP ha inizialmente portato dei benefici. Purtroppo, anche in questo caso, le cellule tumorali hanno sviluppato una mutazione di resistenza (C797S) che, coinvolgendo il residuo necessario per l'ancoraggio degli inibitori, ha causato l'inefficacia di questi ultimi, sottolineando l'elevata adattabilità del tumore. Per fronteggiare questa nuova sfida l'attenzione di numerosi gruppi di ricerca si è spostata nei confronti dello sviluppo di nuovi inibitori reversibili, efficaci anche in presenza della mutazione terziaria, abbandonando in

parte la scelta di inibitori irreversibili e ottenendo diverse molecole promettenti, attualmente sottoposte a trial clinici. Lo scopo di questa tesi è quello di andare ad identificare un nuovo inibitore tirosin-chinasico che agisca con un meccanismo di tipo reversibile e selettivo per la forma mutata EGFR-LT al fine di aumentare la disponibilità di terapie specifiche per il trattamento di pazienti affetti da NSCLC. Il TKI potrebbe essere usato in combinazione con Osimertinib al fine di contrastare l'insorgenza della mutazione terziaria. A questo scopo, è stato utilizzato come punto di partenza il composto FL4, derivato da uno scaffold flavonico in grado di inibire selettivamente l'attivazione di EGFR-LT a concentrazioni nell'ordine del basso micromolare. Al fine di ottimizzare l'efficacia di FL4 e ottenere quindi un composto attivo a concentrazioni nanomolari è stata effettuata una serie di modifiche strutturali ottenendo quindi degli analoghi strutturali di FL4 che sono stati poi testati *in silico*. L'analisi delle loro modalità di binding all'interno della tasca di legame ha permesso di selezionare le molecole più promettenti, rispondenti a specifici requisiti, che sono successivamente state sintetizzate e sottoposte ad ulteriori studi. Dai saggi di inibizione enzimatica, eseguiti nei confronti dell'EGFR wild type e dell'LT-EGFR, il composto FL30, già identificato come particolarmente promettente durante gli studi *in silico*, si è dimostrato particolarmente efficace, sottolineando la validità dell'approccio di design razionale utilizzato. Dopo aver condotto delle verifiche sullo specifico meccanismo di inibizione del recettore, la sua efficacia e selettività è stata testata anche in colture cellulari presentanti recettore mutato e wild-type e sono stati condotti esperimenti per valutare la percentuale di fosforilazione del recettore, e quindi la sua attivazione, in seguito al trattamento con l'inibitore. Dai risultati ottenuti FL30 si è dimostrato citotossico nei confronti di linee cellulari con LT-EGFR anche a basse concentrazioni, mentre l'IC₅₀ nei confronti di linee con EGFR wild-type risulta decisamente più elevato, portando ad un ottimo indice di selettività. Inoltre, gli studi

sull'inattivazione del recettore hanno dimostrato una netta diminuzione della fosforilazione dell'LT-EGFR in seguito a trattamento con FL30, non riscontrata nei confronti di EGFR wild-type, confermando i risultati precedentemente ottenuti *in vitro* e sottolineando l'elevata efficacia e selettività dell'inibitore che si è confermato un ottimo punto di partenza per studi successivi.

Capitolo I

STRUTTURA DELL'EGFR E MECCANISMO DI ATTIVAZIONE

1.1 Struttura dell'EGFR

Il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor) è una proteina transmembrana di 170 kDa, prototipo della famiglia genica HER/ErbB, comunemente conosciuta come famiglia dei recettori dei fattori di crescita epidermici. A quest'ultima appartengono ErbB-1/EGFR, NEU/ErbB-2/HER2, ErbB-3/HER3 e ErbB-4/HER4, la cui attivazione è coinvolta nella proliferazione, nel differenziamento, nell'inibizione dell'apoptosi, e nella migrazione cellulare. L'EGFR è normalmente espresso sulla superficie della maggior parte delle cellule; una sua disfunzione o sovraespressione è implicata in diverse forme di cancro, tra cui carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), cancro coloretale metastatico, glioblastoma, cancro al pancreas ed al seno, rendendolo così un importante obiettivo terapeutico. [1]

L'EGFR è codificato da un gene di 110 Kb situato sul braccio corto del cromosoma 7 (7p11.2) e costituito da 28 esoni. Da questo deriva un precursore di 1210 residui, successivamente processato tramite un taglio proteolitico della regione N-terminale, nella proteina finale di 1186 residui. [2]

Il recettore è costituito da diversi domini: un dominio extracellulare coinvolto nel riconoscimento dei ligandi e nella dimerizzazione, un dominio idrofobico transmembrana ad α -elica, un dominio intracellulare tirosin-chinasico, catalizzatore di reazioni di fosforilazione incrociata, e una coda C-terminale (**Figura 1**).

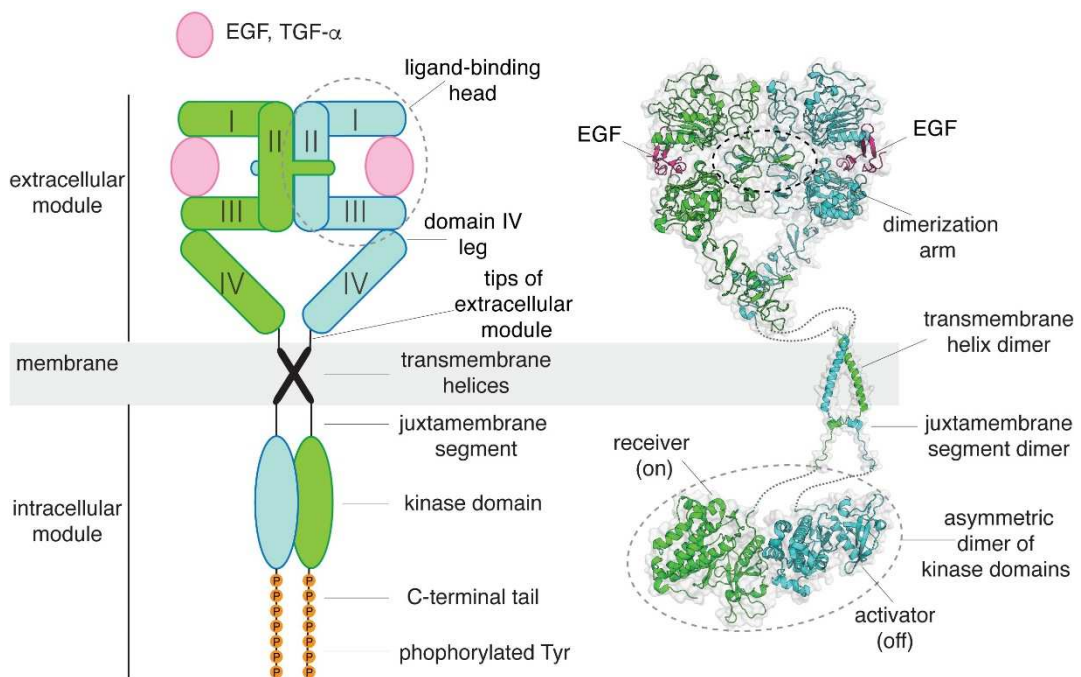


Figura 1. Struttura generale di un dimero di EGFR legato al ligando (EGF), con evidenziate le diverse regioni ed i diversi domini [3].

Il dominio extracellulare di EGFR è suddiviso in quattro sub-domini (I-IV). I domini I (esoni 1-4) e III (esoni 8-12) partecipano al legame con il ligando, mentre i domini II (esoni 5-7) e IV (esoni 13-16) sono regioni ricche in cisteine che non interagiscono con il ligando e sono coinvolti nella formazione di omodimeri o eterodimeri con i domini analoghi di altri membri della famiglia. Il dominio transmembrana è costituito da un singolo segmento idrofobico ad α -elica, lungo 23 amminoacidi, che attraversa la membrana plasmatica. Il dominio intracellulare include un segmento flessibile di circa 40 residui, un dominio tirosin-chinasico e una coda C-terminale. Il dominio tirosin-chinasico ha una funzione catalitica ed è essenziale per la trasduzione del segnale. Questo può essere diviso in due lobi: il lobo N-terminale è costituito da un foglietto- β a 5 strand e da una α -elica, denominata elica-C, mentre quello C-terminale è perlopiù ad α -elica e contiene il loop catalitico. I due lobi sono

connessi da una regione denominata “hinge” che contribuisce alla formazione di una tasca di legame per l’ATP, fondamentale per la fosforilazione dei residui di tirosina presenti nel recettore [4]. Infine, la coda all’estremità C-terminale contiene diversi residui di tirosina che, una volta fosforilati, servono come siti di aggancio per numerose proteine intracellulari, coinvolte nella cascata di trasduzione del segnale. [1]

1.2 Ligandi dell’EGFR

I recettori ErbB sono attivati da diversi fattori di crescita appartenenti alla famiglia EGF (Epidermal Growth Factor), prodotti dalla stessa cellula che esprime i recettori (secrezione autocrina) o dalle cellule vicine (secrezione paracrina). Le proteine appartenenti a questa famiglia sono caratterizzate dalla presenza di un dominio EGF-like composto da tre gruppi intramolecolari legati da ponti disolfuro. Questo dominio conferisce specificità di legame e può essere accompagnato da ulteriori motivi strutturali come domini immunoglobulin-like, siti per il binding all’eparina e siti di glicosilazione. In base alla loro specificità per uno o più recettori appartenenti alla famiglia ErbB, i ligandi possono essere suddivisi in tre diversi gruppi. Il primo gruppo include il fattore di crescita epidermico (EGF), il fattore di crescita trasformante α (TGF- α) e l’ampiregulina (AR), che si legano in modo specifico al recettore EGFR. Il secondo gruppo comprende la betacellulina (BTC), il fattore di crescita legante l’eparina (HB-EGF) e l’epiregulina (EPR), che mostrano una doppia specificità legandosi sia all’EGFR che all’ErbB-4. Infine, il terzo gruppo, composto dalle neureguline (NRG), può a sua volta essere suddiviso in due sottogruppi in base alla loro capacità di legarsi all’ErbB3 e all’ErbB4 o solo a quest’ultimo. Nessuno dei peptidi appartenenti alla famiglia

EGF si lega ad ErbB-2 che tuttavia è importante in quanto partner di eterodimerizzazione preferito da altri membri della famiglia ERbB. [5]

1.3 Meccanismo di attivazione e possibili pathway

L'EGFR presenta due diverse conformazioni: una aperta attiva ed una chiusa auto-inibente. Il legame di un ligando, come EGF o TGF- β , ai domini I e III della regione extracellulare, porta ad un cambio conformazionale che induce la dimerizzazione con un altro EGFR (omodimerizzazione) o con altri recettori appartenenti alla stessa famiglia (eterodimerizzazione), con un totale di 28 differenti combinazioni possibili (**Figura 2**) [6].

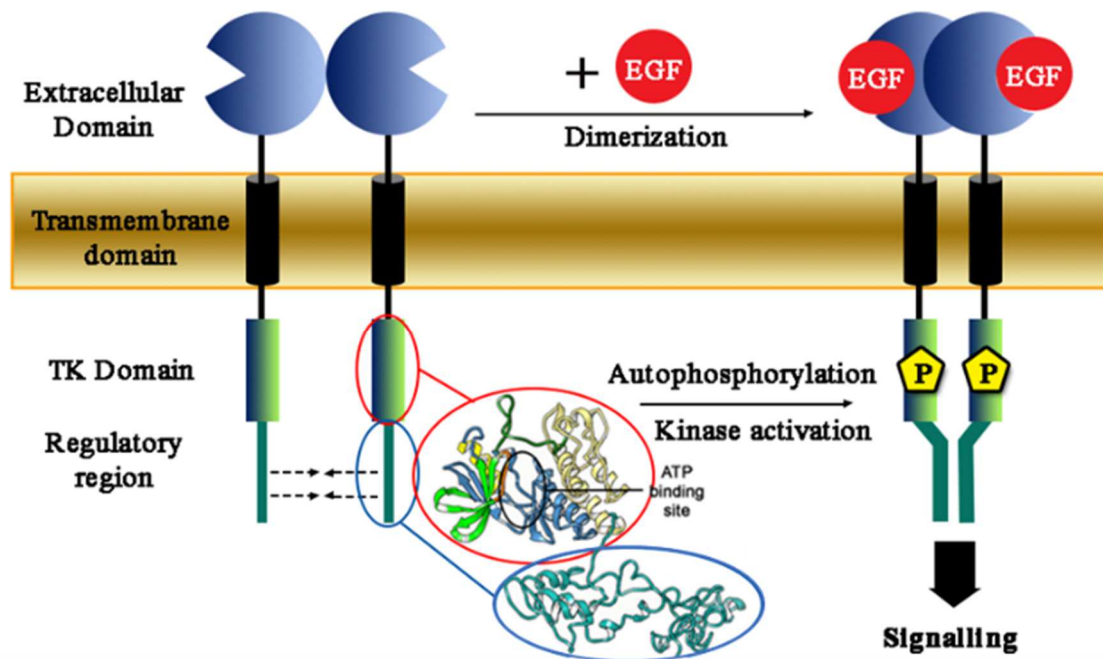


Figura 2. Struttura dell'EGFR e meccanismo di dimerizzazione [6]

L'interazione tra recettori è promossa da un loop di dimerizzazione nel sottodominio II della porzione extracellulare. Il loop di dimerizzazione, nella conformazione attiva, protrude

dall'EGFR e media l'interazione con altri recettori ErbB, portando alla formazione di dimeri composti da due complessi recettore-ligando. In assenza dell'EGF (o di altri ligandi) il recettore assume una conformazione chiusa in cui il braccio di dimerizzazione è bloccato da interazioni intramolecolari con il dominio IV del monomero stesso, impedendo la dimerizzazione. L'interazione con il ligando causa un riarrangiamento del dominio, portando alla conformazione aperta che permette l'attivazione del recettore [7].

Il cambiamento di conformazione del dominio extracellulare si ripercuote anche sulla porzione transmembrana e sul dominio intracellulare, favorendo delle interazioni che stabilizzano il dimero. L'attivazione del recettore e la successiva dimerizzazione promuovono l'autofosforilazione di cinque specifici residui di tirosina, localizzati nel dominio tirosin-chinasico intracellulare, che fungono da siti specifici di aggancio per un ampio range di molecole di segnalazione, con la conseguente attivazione di diverse cascate di trasduzione del segnale, coinvolte nella proliferazione e nella differenziazione cellulare [5][8]. Le principali vie di segnalazione includono la via RAS-RAF-MEK-ERK, che regola la proliferazione e la differenziazione cellulare e la PI3K-AKT, coinvolta nella sopravvivenza e nel metabolismo cellulare, prese in esame successivamente.

Una volta attivato, l'inattivazione del recettore può avvenire in seguito alla sua internalizzazione, seguita dalla degradazione lisosomiale. L'interazione con i ligandi porta alla formazione di cluster di recettori in corrispondenza di vescicole rivestite e all'internalizzazione di questi, tramite endocitosi (**Figura 3**). Gli endosomi così formati possono fondersi con i lisosomi, all'interno della cellula, portando alla degradazione del recettore e del rispettivo ligando, o possono fondersi nuovamente con la membrana, permettendo il riciclo del recettore dopo la sua separazione dal ligando [9].

Ai fini dell'endocitosi sembra particolarmente rilevante il dominio regolatore C-terminale: la presenza di mutazioni puntiformi in questa regione elimina infatti l'endocitosi mediata da recettore. Nell'inattivazione dell'EGFR, e quindi nella sua regolazione, sembra essere importante anche la fosforilazione di specifici residui di serina e treonina, in seguito alla quale si assiste ad una riduzione della trasduzione del segnale conseguente all'attivazione del recettore [10].

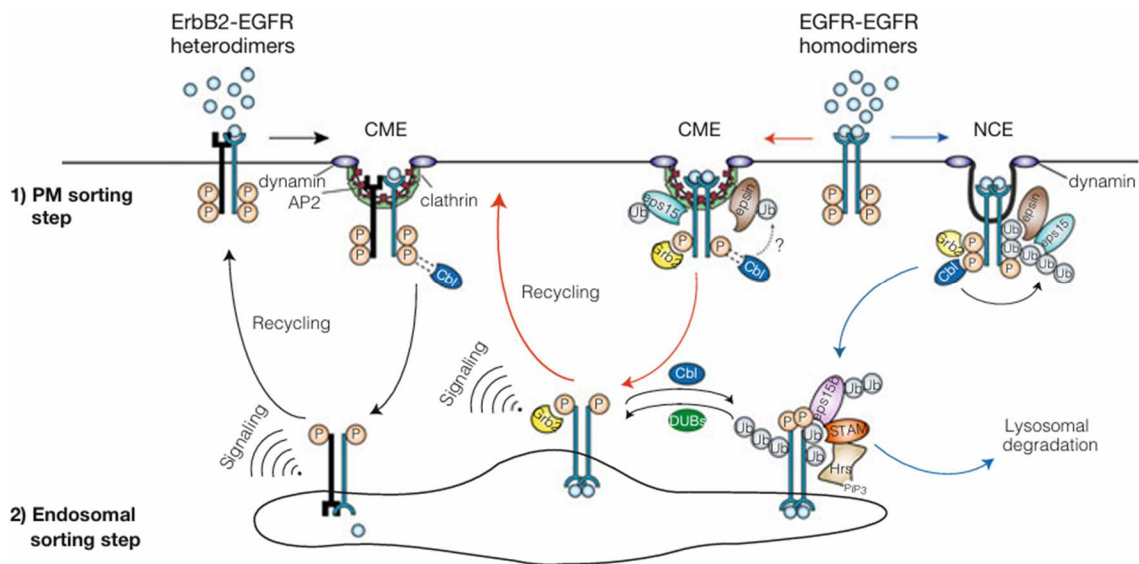


Figura 3. Vie endocitiche e smistamento di eterodimeri e omodimeri di EGFR tramite endocitosi clatrina-mediata (sulla sinistra) o endocitosi non clatrinica (a destra) [11]

1.3.1 RAS-RAF-MEK-ERK

Il pathway di segnalazione RAS-RAF-MEK-ERK, mostrato in **figura 4**, è uno dei principali attivati dall'EGFR. In seguito all'attivazione del recettore, i residui Y1068 e Y1086 si legano

al dominio SH2 della proteina GRB2 (growth factor receptor binding protein 2), mentre i residui Y1148 e Y1173 si legano ai domini SH2 e PTB della proteina SHC (Src homology and collagen protein). Questo legame induce la fosforilazione di SHC, permettendo l'interazione tra questa e GRB2. GRB2, a questo punto, lega la coda C-terminale di SOS1 (son of sevenless 1) tramite il suo dominio SH3. SOS1 funge da fattore di scambio di guanina (GEF), catalizzando il rilascio di GDP e il legame di GTP con la proteina RAS, portando alla sua attivazione.

Una volta attivata, RAS interagisce con RAF-1 inducendone la fosforilazione in corrispondenza di due residui chiave per il legame con MEK1/2. MEK1/2 viene a sua volta attivata da RAF-1 tramite fosforilazione di due residui di serina. Una delle principali funzioni della chinasi MEK1/2 è l'attivazione di ERK1/2, che a sua volta interagisce con oltre un centinaio di substrati, dando il via ad una vasta gamma di risposte fisiologiche e patologiche. Ad esempio, è stato osservato che ERK1/2, tramite la sovraespressione del fattore di trascrizione GATA-2, aumenta la trascrizione della MMP-2, una proteina appartenente ad una famiglia di proteasi zinco e calcio dipendenti (MMPs, metalloproteinasi della matrice), conosciuta per la sua capacità di regolare una vasta gamma di processi cellulari, tra cui adesione, migrazione, invasività, proliferazione e apoptosi [2].

1.3.2 PI3K-AKT-mTOR

Un altro pathway cruciale è la cascata di segnalazione PI3K-AKT-mTOR (**Figura 4**). PI3K è una proteina composta da due domini distinti: una subunità regolatoria, responsabile del legame con il recettore EGFR, e una subunità catalitica, in grado di fosforilare il lipide di

membrana fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP2), trasformandolo in fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP3).

PIP3 funge da secondo messaggero chiave, collegando l'attività chinastica di PI3K a una vasta rete di pathways a valle. L'interazione tra PI3K e l'EGFR è mediata dalla proteina adattatrice GAB1 (GRB2-associated binder), che si lega al dominio SH3 della proteina GRB2 tramite un dominio ricco in prolina. Questo evento attiva la fosforilazione di GAB1 in corrispondenza di specifici siti di legame per la subunità regolatoria di PI3K. In seguito all'attivazione di PI3K e alla produzione di PIP3, la proteina AKT viene traslocata attraverso la membrana plasmatica e attivata tramite fosforilazione da parte delle chinasi PDK1 e mTORC2. AKT media numerose risposte fisiologiche che favoriscono la sopravvivenza cellulare, ad esempio fosforilando la proteina BAD (Bcl-2-associated death promoter) previene la sua attività inibitoria nei confronti del fattore antiapoptotico BCL-XL. Inoltre, AKT fosforila la proteina TSC2 (tuberous sclerosis complex 2), inattivandola e portando all'attivazione di mTORC1, che è normalmente represso da TSC2. L'attivazione di mTORC1 porta ad un aumento della sintesi di proteine come la ciclina D1, compromettendo il checkpoint della fase S e forzando la progressione del ciclo cellulare [2].

I pathway di segnalazione dell'EGFR, quando vengono deregolati, svolgono un importante ruolo nell'insorgenza di forme tumorali, tramite la modulazione della progressione del ciclo cellulare e l'inibizione dell'apoptosi. Numerosi meccanismi possono portare ad un'attivazione aberrante del recettore, tra cui sovraespressione del recettore, amplificazione genica, mutazioni attivanti, sovraespressione dei ligandi e perdita dei meccanismi di regolazione [2].

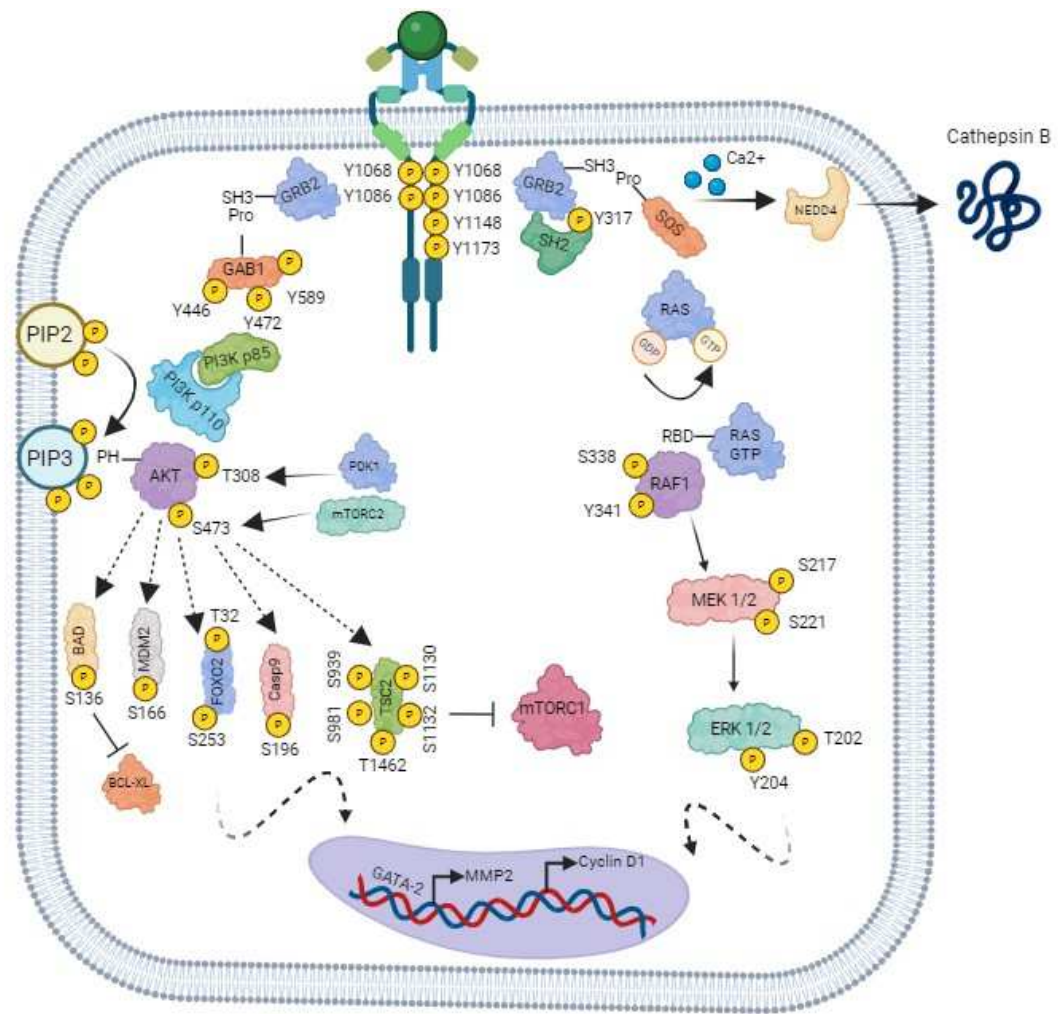


Figura 4. Recettore EGFR e principali pathway di segnalazione a valle nel NSCLC. In seguito al legame del ligando, il passaggio dell'EGFR alla sua conformazione attiva innesca una serie di pathway cellulari complessi ed interconnessi, tra cui le cascate di segnalazione RAS-RAF-MERK-ERK MAPK, PI3K-AKT-mTOR e NEDD4/catepsina, importanti nella mediazione di processi fisiologici come crescita, differenziazione, migrazione e inibizione dell'apoptosi [2]

1.4 Riconoscimento e legame dell'ATP

L'attivazione dell'EGFR innesca l'autofosforilazione dei residui di tirosina presenti nella coda C-terminale; affinché questo evento possa verificarsi è fondamentale l'energia fornita dall'ATP, che deve interagire con una specifica tasca idrofobica situata tra i lobi N-terminale e C-terminale del dominio tirosin-chinasico.

Questa tasca è formata da una serie di residui amminoacidici conservati che facilitano il posizionamento dell'ATP per il trasferimento del gruppo fosfato ai residui di tirosina ed il rilascio dell'ADP.

In particolare, l'ATP interagisce con una specifica porzione della tasca, la regione hinge, formando due legami idrogeno con i residui polari Gln791 e Met793, tramite l'adenina. In contemporanea stabilisce diverse interazioni con le due regioni idrofobiche presenti nella tasca (Leu844, Val726, Ala743, Leu718 e Leu792), mentre il gruppo fosfato idrofilico dell'ATP è mantenuto in posizione da interazioni specifiche con Lys745 e con Asp855 della regione DFG (Asp855-Phe856-Gly857), situata all'estremità N-terminale del loop di attivazione. Nella conformazione attiva il residuo Asp855 è infatti orientato in direzione del sito di legame dell'ATP e permette ad uno ione Mg^{2+} di legarsi al fosfato β e γ di questa. Al contrario, nella conformazione inattiva, il motivo DFG è ruotato ed impedisce la coordinazione dello ione Mg^{2+} nel sito catalitico.

L'affinità dell'ATP per la tasca di legame è influenzata anche dal residuo Thr790, denominato "gatekeeper" per la sua dimensione ingombrante e per la sua posizione in grado di controllare l'accessibilità alla tasca [4].

Data l'importanza del legame dell'ATP per l'attivazione del recettore questa regione è stata utilizzata come bersaglio comune per molti inibitori tirosin-chinasici (TKIs) che agiscono

mediante un trattamento ATP-competitivo e che sono stati sviluppati per il trattamento di diverse tipologie tumorali (tra cui il NSCLC), causate da mutazioni o da sovraespressione di EGFR.

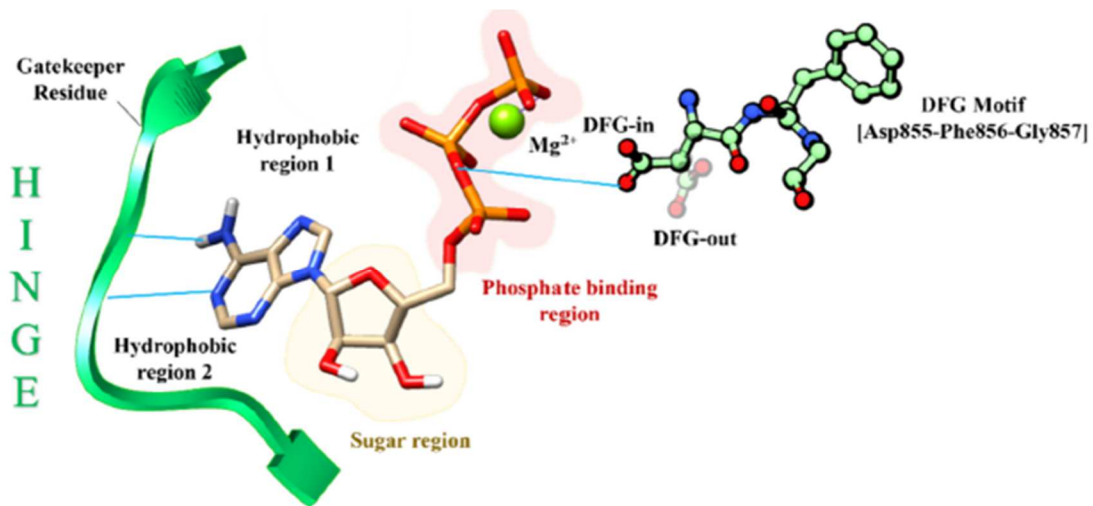


Figura 5. Farmacoforo dell'ATP all'interno della sua tasca di legame nell'EGFR [3]

Capitolo II

PRINCIPALI MUTAZIONI DELL'EGFR COINVOLTE NEL NSCLC E NELLA FARMACO-RESISTENZA

2.1 Mutazioni attivanti

Il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC, non-small cell lung cancer) è una delle forme tumorali con maggiore incidenza al mondo, rappresentando circa il 75% dei casi di tumore ai polmoni [6]. Diversi studi hanno mostrato che circa il 90% dei casi di NSCLC è dovuto ad una sovraespressione o a un'errata attivazione dell'EGFR [8]. Mutazioni dell'EGFR possono essere riscontrate a livello del dominio extracellulare, del dominio tirosin-chinasico e della coda C-terminale e sono spesso correlate all'insorgenza di diverse forme tumorali. Alcuni tipi di cancro sembrano essere caratterizzati da mutazioni in regioni specifiche, ad esempio in casi di NSCLC sono state riscontrate mutazioni quasi esclusivamente a livello del dominio tirosin-chinasico. Queste mutazioni possono causare un'attivazione costitutiva del recettore, permettendo la dimerizzazione anche in assenza di ligandi e contribuendo quindi alla proliferazione incontrollata delle cellule tumorali in seguito all'attivazione dei pathway a valle [1].

Le mutazioni sono per questa ragione definite attivanti. Le più comuni si localizzano a livello di quattro esoni (18-21) del gene, che codificano per il dominio tirosin-chinasico del recettore e, a livello strutturale, ricadono all'interno della tasca di legame dell'ATP, che è il principale sito di legame degli inibitori tirosin-chinasici sviluppati per il trattamento del

NSCLC. Queste mutazioni si classificano in tre principali categorie, dove quelle appartenenti alle classi I e II risultano le più sensibilizzanti nei confronti del trattamento con TKIs [12].

MUTAZIONI DI CLASSE I: rappresentano circa il 44% di tutte le mutazioni del dominio tirosin-chinasico e consistono in piccole delezioni dell'esone 19, tra cui la più comune riguarda cinque amminoacidi, corrispondenti al frammento Glu746-Ala750 (E19del) [12].

MUTAZIONI DI CLASSE II: sono sostituzioni di singoli nucleotidi, ritrovate principalmente tra l'esone 18 e il 21, che causano una variazione negli amminoacidi codificati. La mutazione puntiforme più comune è la transversione di una timina in guanina, che porta alla sostituzione della leucina 858, localizzata nell'esone 21, con un'arginina (L858R). Altre mutazioni di classe II, rappresentanti un 4% di tutte le mutazioni attivanti del dominio tirosin-chinasico, includono la sostituzione della glicina 719 con una serina, alanina o cisteina. Un ulteriore 6% è rappresentato da mutazioni missenso [12].

MUTAZIONI DI CLASSE III: sono duplicazioni e/o inserzioni in frame nell'esone 20 e rappresentano il restante 5% delle mutazioni attivanti, insieme ad altre mutazioni a bassa frequenza (< 1%) come V765A e T783A [12].

Tra tutte le possibili mutazioni attivanti menzionate, le più rilevanti includono la mutazione E19del e la L858R. La mutazione L858R è la mutazione puntiforme attivante più comune (rappresenta circa il 40% di tutte le mutazioni del dominio tirosin-chinasico) e ricade nel loop di attivazione (A loop), dove agisce stabilizzando la conformazione attiva attraverso delle interazioni specifiche tra il residuo mutato (Arg858) e gli amminoacidi dell'elica-C. La delezione E19del agisce in modo simile, causando un cambio di conformazione risultante in un restringimento della tasca di legame dell'ATP e in una stabilizzazione della conformazione attiva anche in assenza di ligando [8]. Per il trattamento del NSCLC in

presenza di queste mutazioni attivanti è stata sviluppata una prima classe di TKIs. Tuttavia, durante il trattamento, molti pazienti sviluppano una resistenza acquisita, data dall'insorgenza di ulteriori mutazioni.

2.2 Mutazioni di resistenza

I TKIs sviluppati per il trattamento di pazienti positivi a mutazioni attivanti nel gene EGFR si sono dimostrati particolarmente efficaci. Tuttavia, in seguito al trattamento con questi agenti, la maggior parte dei pazienti sviluppa delle resistenze, date dall'insorgenza di nuove mutazioni a carico del gene. Tra queste mutazioni secondarie, una delle più comuni è la sostituzione della treonina 790, dell'esone 20, in metionina (T790M). Questa mutazione è stata ritrovata in presenza sia della delezione dell'esone 19, sia della sostituzione L858R nell'esone 21 e può essere riscontrata sullo stesso allele che presenta la mutazione attivante. A livello strutturale ricade nella tasca di legame dell'ATP, ed è in grado di stabilizzare il legame con quest'ultima formando delle interazioni $s-\pi$ con l'anello aromatico dell'adenina (**Figura 6A**). Una maggiore affinità del recettore per l'ATP è responsabile della perdita di efficacia degli TKIs che competono con questa per il legame nella tasca. Altre mutazioni di resistenza meno comuni includono le sostituzioni D761Y, T854A e L747S, che sorgono in presenza della mutazione attivante L858R; tuttavia la mutazione T790M da sola racchiude dal 50% al 60% dei casi di resistenze acquisite nei confronti di trattamenti con inibitori tirosin-chinasici [13]. Per far fronte al problema sono state sviluppate una seconda e una terza generazione di inibitori, basati su un meccanismo differente rispetto alla prima generazione, tuttavia una nuova mutazione della cisteina 797 in serina (C797S) è emersa, annullando l'efficacia di questa ultima generazione.

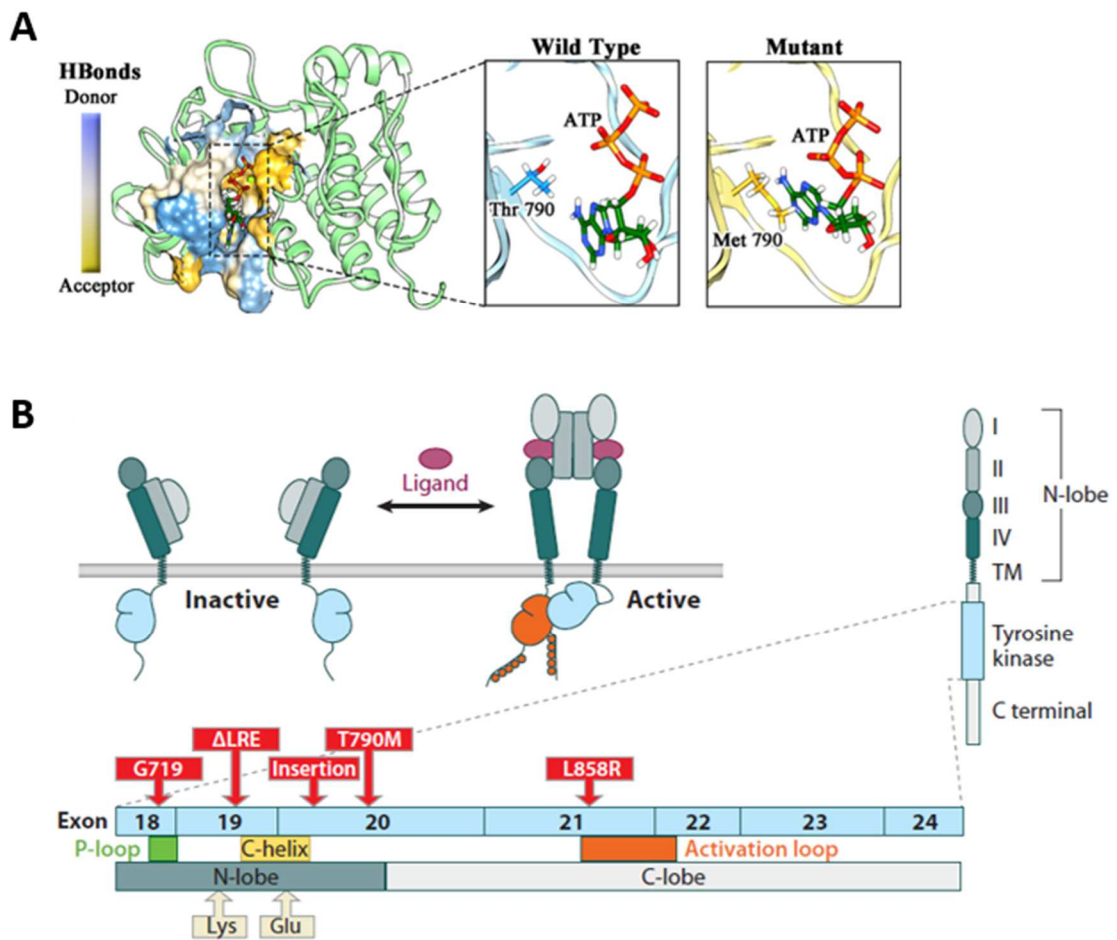


Figura 6. (A) Mappa di donatori ed accettori di legami idrogeno con l'ATP all'interno di EGFR wild-type [2]. (B) Localizzazione delle principali mutazioni del dominio TK dell'EGFR [13]

Capitolo III

TERAPIA A BERSAGLIO MOLECOLARE: EVOLUZIONE DEGLI INIBITORI TIROSIN-CHINASICI (TKIs) NELLA TERAPIA PER IL NSCLC

3.1 Gli inibitori tirosin-chinasici (TKIs)

Dato che l'EGFR risulta sovraespresso o mutato in molte tipologie tumorali è stato ampiamente utilizzato come target per lo sviluppo di numerosi farmaci specifici. Attualmente, le principali strategie terapeutiche includono due approcci: l'utilizzo di anticorpi monoclonali, diretti contro il dominio extracellulare del recettore per impedirne la dimerizzazione, o l'uso dei TKIs. Si tratta di piccole molecole in grado di legarsi selettivamente alla tasca di legame dell'ATP del recettore mutato, inibendo la sua fosforilazione e, quindi, la sua attivazione [9]. In base al loro meccanismo di legame, i TKI possono essere classificati come inibitori reversibili o irreversibili. Gli inibitori reversibili interagiscono con il sito di legame dell'ATP attraverso interazioni non covalenti, come interazioni elettrostatiche, idrofobiche e legami idrogeno. Al contrario, gli inibitori irreversibili formano legami covalenti con il sito di legame [14]. Negli ultimi anni, diversi TKI sono stati individuati e approvati dalla FDA (Food and Drug Administration), migliorando significativamente la prognosi di pazienti affetti da diverse forme tumorali, tra cui il NSCLC. Tuttavia, trattamenti ripetuti con questi farmaci hanno causato l'instaurarsi di fenomeni di resistenza, dovuti all'insorgere di mutazioni puntiformi nel gene del recettore che hanno causato la sostituzione di amminoacidi chiave per il legame degli inibitori,

compromettendo la loro efficacia. Per affrontare questo problema, si è resa necessaria una continua ricerca per sviluppare nuove molecole funzionali, basate su diverse strategie di interazione. Dal 2000 ad oggi, sono state individuate quattro principali classi di inibitori tirosin-chinasici, riassunte nella figura seguente (**Figura 7**).

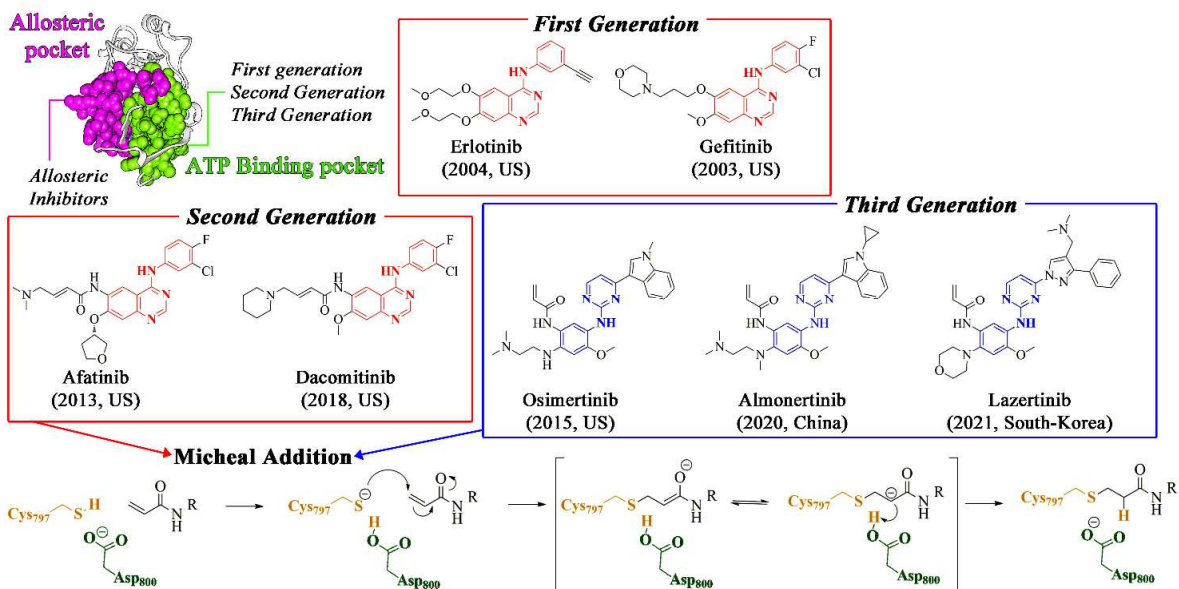


Figura 7. Strutture chimiche dei principali TKIs appartenenti alla prima, seconda e terza generazione [2]

3.2 Prima generazione di TKIs

A questa generazione appartengono i primi TKIs sviluppati, diretti selettivamente contro le due principali mutazioni dell'EGFR riscontrate: la delezione E19del e la mutazione L858R. I primi farmaci approvati appartenenti a questa classe, Erlotinib e Gefitinib, presentano una struttura derivata da una 4-anilinochinazolina in grado di interagire reversibilmente con la tasca di legame dell'ATP nel dominio tirosin-chinasico, competendo con quest'ultima [2].

Nel dettaglio, il primo azoto della chinazolina crea legami idrogeno con la metionina 793 della regione hinge ed interagisce idrofobicamente con diversi residui presenti nella tasca [9]. Nonostante i TKIs di prima generazione abbiano mostrato un'ottima efficacia, la maggior parte dei pazienti trattati sviluppa una resistenza a questi agenti dovuta, nella maggior parte dei casi (60-70% dei casi di resistenza), all'insorgere della mutazione T790M il che come detto nel capitolo precedente, porta ad un aumento dell'affinità del recettore nei confronti dell'ATP. Essendo i TKIs di prima generazione degli inibitori competitivi, la maggiore affinità dell'ATP per il sito di legame porta ad una perdita della loro efficacia, dovuta anche ad un maggior ingombro sterico della metionina che rende più difficile l'ingresso del farmaco nella tasca [2]. Nonostante lo sviluppo di nuovi farmaci in grado di agire in presenza di EGFR T790M, gli inibitori di prima generazione sono ancora utilizzati per il trattamento di tumori causati da EGFR mutante o da una sovraespressione di questo, sia da soli sia in combinazione con altri farmaci.

3.3 Seconda generazione di TKIs

Per fronteggiare l'insorgenza della nuova mutazione T790M è stata sviluppata una seconda generazione di TKIs, non più basati sulla competizione con l'ATP per l'interazione con la tasca di legame. Questi agenti, come i precedenti, si basano su una 4-anilinochinazolina, cui è stato tuttavia aggiunto un gruppo acrilamide elettrofilo che funge da accettore di Michael permettendo la formazione di un legame irreversibile con lo zolfo della Cys797 tramite attacco nucleofilo della cisteina al carbonio- β elettrofilo dell'acrilamide, assistito dall'Asp800, impedendo il legame dell'ATP anche in presenza della mutazione T790M (**Figura 7**). L'attacco degli inibitori avviene selettivamente su questa cisteina grazie ad altre

interazioni non covalenti che stabilizzano la molecola all'interno della tasca di legame dell'ATP, simili alle interazioni che stabilizzano gli inibitori competitivi di prima generazione. Esempi di questa classe di inibitori sono l'Afatinib e il Dacomitinib (**Figura 7**) che, pur mostrando una maggiore efficacia rispetto a Erlotinib e Gefitinib, mantengono una bassa selettività per l'EGFR mutato rispetto al wild-type, portando a diversi effetti collaterali come stomatiti, anoressia, diarrea e rash cutanei [15]. Inoltre, la chinazolina presente nella struttura interferisce con la catena laterale della metionina 790, rendendo necessaria la somministrazione di dosi elevate per avere ottenere gli effetti terapeutici voluti, non compatibili con gli effetti indesiderati riscontrati. Per far fronte a queste problematiche è quindi stata sviluppata una terza generazione di TKIs [2].

3.4 Terza generazione di TKIs

I TKIs di terza generazione sono stati sviluppati con l'obiettivo di aumentare la specificità nei confronti di EGFR mutato, in particolare in presenza di mutazione T790M, rispetto al recettore wild-type, portando ad una riduzione degli effetti collaterali causati dagli inibitori di seconda generazione. A differenza dei precedenti, questa classe di inibitori si basa su uno scaffold di anilino-pirimidina che permette di massimizzare la loro interazione con la tasca di legame dell'ATP, basando sempre il loro meccanismo di azione su un legame irreversibile con la Cys797. Uno dei TKIs di terza generazione più recente, l'Osimertinib (**Figura 7**), sviluppato da AstraZeneca, è stato per anni il principale farmaco per il trattamento di NSCLC e ancora oggi viene utilizzato come trattamento di prima linea nei confronti di NSCLC con EGFR^{T790M}. Nonostante il successo di questa classe di inibitori, sono successivamente insorti nuovi meccanismi di resistenza, similmente a quanto precedentemente accaduto in seguito a

trattamenti con inibitori di prima e seconda generazione. Questo sottolinea l'elevata adattabilità delle cellule tumorali ai trattamenti farmacologici che le permette di trovare sempre una "via d'uscita". Particolarmente rilevante è la mutazione C797S, sull'esone 20, che consiste nella sostituzione del tiolo presente sulla cisteina 797 con il gruppo idrossile della serina, notevolmente meno nucleofilo, impedendo la formazione del legame covalente con gli inibitori di seconda e terza generazione. Questa mutazione rappresenta ad oggi il principale meccanismo di resistenza al trattamento con Osimertinib e ha portato alla ricerca di nuove strategie e molecole per fronteggiare l'evoluzione di forme tumorali che esprimono EGFR triplo mutato (L858R-T790M-C797S) [2]. Nonostante la mutazione C797S sia la più comune, la resistenza al trattamento con Osimertinib può essere data dall'insorgere di altre mutazioni puntiformi più rare. La mutazione del residuo G796 (G796R, G796S, G796D) può ad esempio interferire stericamente con l'interazione tra la molecola e l'EGFR. Allo stesso modo, anche mutazioni dei residui L792, L718 e G719 della regione hinge possono interferire con il gruppo metossi dell'anello fenilico, impedendone il legame. In ultimo, la resistenza agli inibitori di terza generazione può anche essere acquisita mediante meccanismi indipendenti dall'EGFR che portano all'attivazione di pathway alternativi in grado di bypassare quelli attivati dal recettore. Queste aberrazioni molto spesso coesistono con mutazioni terziarie dell'EGFR, sottolineando la complessità e l'eterogeneità dell'evoluzione delle forme tumorali in risposta al trattamento con TKI [16].

3.5 Quarta generazione di TKIs

In seguito all'insorgere della mutazione C797S è stata scoperta una quarta generazione di TKIs, attualmente in fase di sperimentazione clinica, in grado di agire in presenza di EGFR

T790M indipendentemente dalla presenza della mutazione terziaria C797S. Questa nuova classe di TKI include molecole con differenti scaffold, in grado di agire o come competitori dell'ATP per il legame alla tasca, o come inibitori allosterici.

INIBITORI ALLOSTERICI: il meccanismo di azione di questa classe di inibitori si basa sul loro legame selettivo con la tasca allosterica, situata tra l'elica-C e il loop di attivazione (A loop). Questa tasca allosterica è accessibile solamente in presenza di specifiche mutazioni, che destabilizzano lo stato inattivo dell'EGFR (L858R, L858R/T790M). Il legame di questi inibitori alla tasca allosterica esposta stabilizza la conformazione inattiva ed impedisce l'attivazione delle chinasi. EAI001 e EAI045 (**Figura 8**) sono esempi di molecole appartenenti a questa classe di inibitori, tuttavia, esse non sono sufficienti per l'inattivazione dell'EGFR se somministrate singolarmente [2].

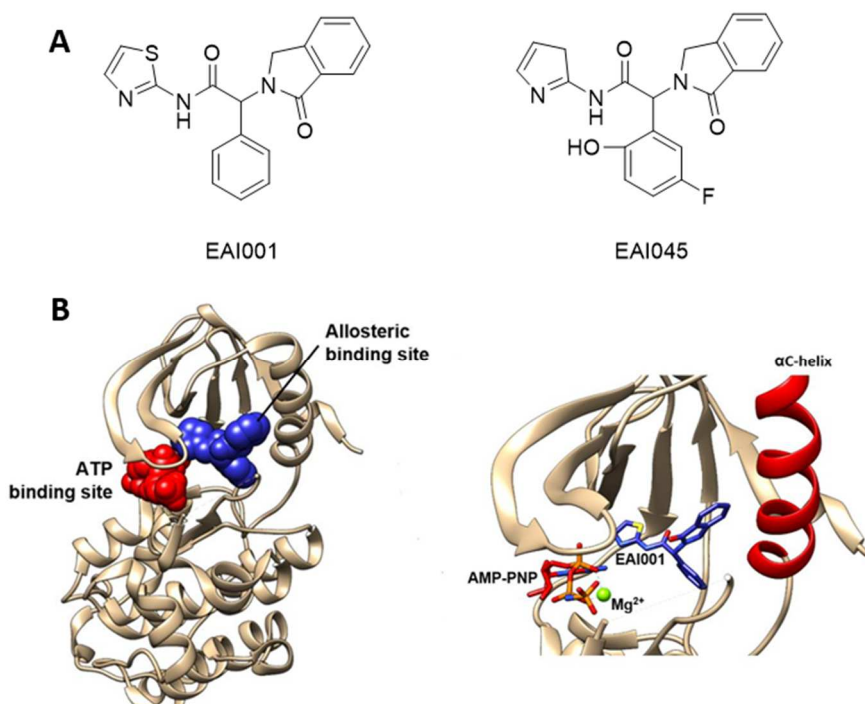


Figura 8. (A) Struttura di EAI001 e EAI045. (B) Localizzazione del sito allosterico e visualizzazione di EAI001 all'interno della tasca di legame [17]

In particolare, EAI045 si è dimostrato molto più attivo nei confronti di EGFR mutanti non in grado di dimerizzare. L'anticorpo monoclonale Cetuximab impedisce la dimerizzazione dell'EGFR, impedendo il legame dell'EGF, ed è quindi stato utilizzato in associazione a questi inibitori di quarta generazione, per promuovere il loro legame nel sito allosterico. Tuttavia, a differenza di EAI001 e EAI045, l'anticorpo monoclonale non è selettivo per il recettore mutato ed agisce anche su quello wild-type portando a tossicità e a diversi effetti collaterali [18].

INIBITORI ATP-COMPETITIVI: un'altra classe di molecole molto promettenti comprende inibitori di quarta generazione in grado di competere con l'ATP per l'interazione con la tasca di legame di questa. Nel complesso questi inibitori, diversi dei quali sono attualmente sottoposti a trial clinici, condividono uno scaffold anilino-pirimidinico, particolarmente efficace nell'interazione con la tasca di legame [2].

Esempi di molecole appartenenti a questa classe sono il BLU-945 (**Figura 9B**): un TKI reversibile contenente uno scaffold di N-(piridin-2-il)-pirimidin-4-ammina, funzionalizzato con una piperidina, ottenuto dalla Blueprint Medicines attraverso un lungo processo di screening e successiva ottimizzazione della struttura. La formazione di un legame idrogeno bidentato tra l'aminopiridina e la regione hinge e l'interazione idrofobica tra la piperidina ed il residuo gatekeeper mutato M790, mostrati in **figura 9A**, rendono questo inibitore particolarmente efficace e selettivo per il recettore mutato rispetto al wild-type. La terapia con BLU-945 ha dimostrato un'elevata attività antitumorale *in vivo*, tuttavia l'efficacia nei confronti della mutazione ex19Del si è rivelata scarsa ed attualmente i risultati più promettenti derivano da una somministrazione in combinazione con Osimertinib [2].

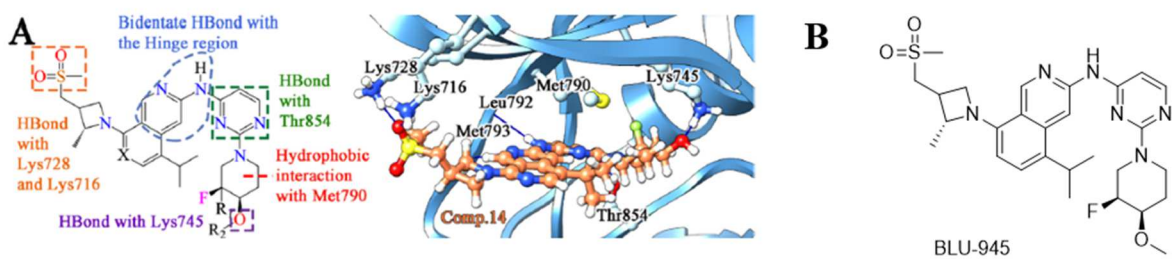


Figura 9. (A) Farmacoforo di BLU-945 all'interno dell'EGFR mutato [2]. (B) Struttura di BLU-945

In generale, i promettenti risultati ottenuti da questa classe di molecole ha spostato l'attenzione di molti gruppi di ricerca nei confronti dello sviluppo di nuovi inibitori reversibili, efficaci anche in presenza del triplo mutante, abbandonando in parte la scelta di inibitori irreversibili.

Capitolo IV

I FLAVONI: UN PROMETTENTE SCAFFOLD CHIMICO PER LO SVILUPPO DI TKIs

4.1 Struttura, caratteristiche, e proprietà dei flavoni

I flavoni sono una sottoclasse di composti chimici naturali, appartenenti alla classe dei flavonoidi, molecole polifenoliche a basso peso molecolare derivate dal metabolismo secondario delle piante, che hanno dimostrato diverse proprietà benefiche grazie alla loro interazione con numerosi target coinvolti in numerosi processi biologici. Da un punto di vista strutturale i flavoni sono caratterizzati da un backbone di 2-fenilcromo-4-one, formato da due anelli aromatici a sei atomi di carbonio, chiamati rispettivamente A e B, uniti ad un terzo anello a tre atomi di carbonio, denominato anello C. Principali gruppi funzionali della struttura sono un doppio legame tra le posizioni 2 e 3 e un gruppo chetonico in posizione 4 nell'anello C.

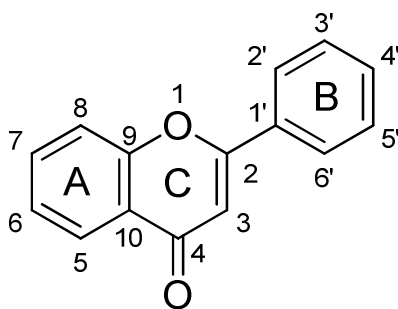


Figura 10. Struttura di un flavone

Uno scaffold flavonico è presente in numerosi composti con proprietà farmacologiche e, grazie ai numerosi pattern di sostituzioni possibili, queste strutture coprono un ampio range di attività biologiche che hanno attirato l'attenzione di diversi gruppi di ricerca, portando alla scoperta di diversi composti lead con proprietà antiossidanti, antiproliferative, antitumorali, antinfiammatorie e antimicrobiche da cui sviluppare farmaci utilizzati per diverse patologie tra cui cancro, disturbi neurodegenerativi, disturbi cardiovascolari ecc.

4.2 Proprietà antitumorali dei flavoni

Diversi studi hanno dimostrato che alcuni flavoni possiedono delle proprietà antitumorali, agendo attraverso meccanismi diversi. Un importante bersaglio terapeutico nel trattamento del cancro è rappresentato da chinasi, come le chinasi dipendenti da ciclina (CDKs), la GSK3 e la chinasi regolata dalla tirosina-1A (DYRK-1A), che giocano spesso un ruolo critico nella patogenesi del cancro. Alcuni flavonoidi, opportunamente modificati, sono stati sviluppati per agire come inibitori delle principali chinasi coinvolte nell'insorgenza del cancro, dimostrando un'attività antiproliferativa contro diverse linee cellulari.

Molte tipologie di tumori al seno sono causate da deregolazioni del pathway di segnalazione in seguito al legame degli estrogeni col il corrispondente recettore. Le aromatasi sono degli enzimi essenziali per la conversione degli androgeni in estrogeni, e quindi per la biosintesi di questi ultimi, svolgendo un ruolo essenziale nello sviluppo tumorale, in particolare nei confronti di tumori al seno dipendenti da ormoni. Un approccio terapeutico, in questo caso, riguarda l'inibizione delle aromatasi e numerosi flavonoidi si sono mostrati efficaci come loro inibitori, guadagnando attenzione per potenziali utilizzi clinici futuri grazie ai minori effetti collaterali suscitati, al confronto con gli inibitori sintetici attualmente sul mercato

[19]. Ancora, numerosi flavonoidi esplicano la loro attività antitumorale andando ad impedire l'angiogenesi, fondamentale per il sostentamento e la crescita delle cellule tumorali. In particolare, tra i diversi flavoni che hanno mostrato un'attività antitumorale, i derivati ammino-funzionalizzati hanno dimostrato di avere un'elevata selettività verso alcune tipologie di cancro e sono quindi considerati una classe promettente di agenti antitumorali. Esempi di queste molecole sono il composto NSC686288, con attività antiproliferativa selettiva nei confronti di cellule di tumore al seno e al rene o il Flavopiridolo, appartenente ad una sottoclasse di composti contenenti ammine terziarie in grado di inibire selettivamente le chinasi ciclina dipendenti (CDKs) [19].

4.3 I flavoni come scaffold efficace per lo sviluppo di TKIs selettivi per le forme mutate di EGFR

Lo scaffold flavonico è risultato essere un ottimo candidato per lo sviluppo di TKIs efficaci e selettivi nei confronti di alcune forme mutate del recettore EGFR (L858R/T790M e L858R/T790M/C797S) [20]. Utilizzando un approccio *in silico*, sono state dapprima effettuate una serie di modifiche strutturali sullo scaffold flavonico volte a (i) promuovere l'interazione con alcune regioni chiavi presenti nella tasca di legame di ATP e (ii) ottenere un composto selettivo per le forme mutate mediante interazione specifica con due dei residui mutati, M790 e R858. Un'inibizione efficace prevede che la molecola sia ancorata a livello della regione hinge della tasca di legame dell'ATP (Q791-G797) mediante un legame idrogeno bidentato fino ad estendersi nella regione di legame del fosfato, interagendo con il residuo catalitico K745. I composti disegnati sono stati quindi sottoposti ad uno screening virtuale nei confronti della forma WT, L858R/T790M e L858R/T790M/C797S (three-track

virtual screening). Successivamente sono stati selezionati i composti che mostravano una maggiore affinità di legame per le forme mutate rispetto che per quella wild-type (**Figura 11A**).

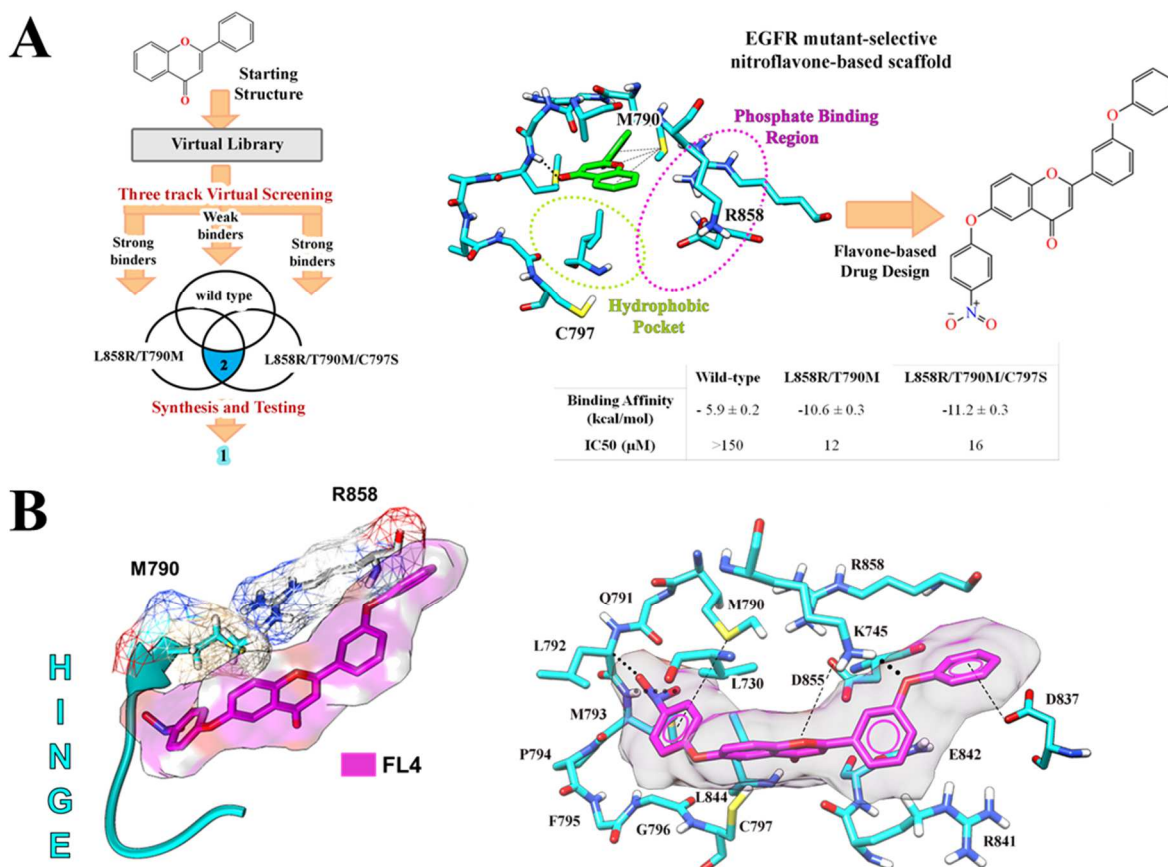


Figura 11. (A) Diagramma di flusso per l'identificazione del nitroflavone FL4 tramite three-track virtual screening, interazione con LT-EGFR e valori dell'affinità di binding e dell'IC50 ottenuti dagli esperimenti di docking. (B) Interazioni di FL4 all'interno del sito di legame dell'LT-EGFR [20]

Tra i composti testati, FL4 si è dimostrato efficace nell'inibire la forma mutata EGFR-L858R/T790M (EGFR-LT), indipendentemente dalla presenza della mutazione terziaria C797S con una attività nell'ordine del basso micromolare (IC_{50} , 12 μ M) e con una buona selettività rispetto alla forma WT del recettore rendendolo un ottimo punto di partenza per la sintesi di inibitori ancora più selettivi ed efficaci (**Figura 11A**).

In particolare, sia nei confronti dell'LT-EGFR sia nel triplo mutato, FL4 interagisce con la regione hinge della tasca di legame dell'ATP, estendendosi fino alla regione PB (Phosphate Binding region), con un modello di interazione comune alle due forme di EGFR. Il gruppo nitro in posizione *para* del fenossi ancora l'inibitore a livello della regione hinge tramite un legame idrogeno bidentato, formando un'interazione N-H \cdots O con il backbone di M793 e un'interazione C-H \cdots O con L792 nell'LT-EGFR e con G796 in EGFR L958R/T790M/C797S. Inoltre, il gruppo fenossi legato al C3 dell'anello B si estende verso la periferia della tasca di legame, interagendo con diversi residui target (K745, R858 e D855). L'intera posa di legame risulta stabilizzata da diverse interazioni che coinvolgono il sistema π dei gruppi aromatici; nel dettaglio, nel complesso con l'LT-EGFR, l'anello A forma un'interazione π -zolfo con il residuo mutato M790 e un legame C-H/ π con la regione idrofobica (A743, L844 e L722) e con il residuo C797. Tutte queste interazioni contribuiscono al posizionamento del gruppo nitro in prossimità della regione hinge, permettendo la formazione del legame idrogeno bidentato menzionato sopra. L'anello B è invece stabilizzato da interazioni C-H/ π con i residui L862 e A859 del loop di attivazione e π -anione con il residuo D837. Come previsto l'O-spacer presente sull'anello B agisce da accettore di legami idrogeno, formando un legame con il gruppo amminico della catena laterale di K745 ed interagendo con R858 e D855 (**Figura 11B**).

I risultati ottenuti, in accordo con quanto visto tramite gli esperimenti di docking, hanno mostrato che il composto FL4 è in grado di inibire la fosforilazione degli EGFR mutanti a concentrazioni micromolari, mostrando una buona selettività rispetto al wild-type e confermando dunque il suo potenziale utilizzo come punto di partenza per la sintesi di nuovi inibitori tirosin-chinasici in grado di inibire la fosforilazione a concentrazioni nanomolari [20].

Capitolo V

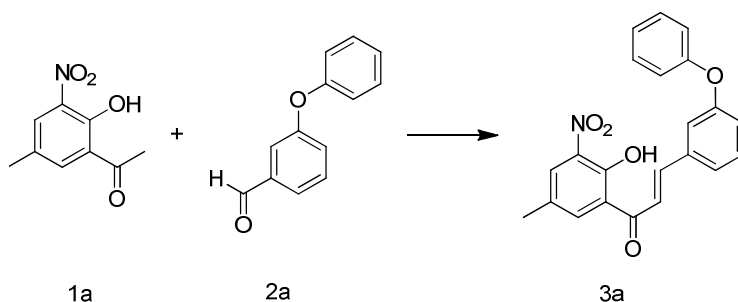
MATERIALI E METODI

5.1 Sintesi e caratterizzazione

Tutti i composti utilizzati per la sintesi sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich Co. (Stenheim, Germania) e utilizzati senza purificazione. Tutti i solventi erano analiticamente puri e sono stati anidrificati prima dell'uso. Le TLC sono state eseguite su gel di alluminio pre-rivestiti con gel di silice 60 F254 (Merck). La cromatografia su colonna è stata eseguita utilizzando gel di silice 60 (230-400 mesh). Le analisi MS ad alta risoluzione (HRMS), ESI e HPLC-MS sono state eseguite sullo spettrometro di massa Waters Xevo G2-XF QTof. La determinazione allo spettrometro di massa è stata eseguita nella modalità ioni positivi per tutti i composti, e nella modalità ioni negativi per il composto 1b. Gli spettri NMR ^1H e ^{13}C sono stati registrati su spettrometri Agilent Technologies 400 MHz Premium Shielded, Bruker Ascend 500 Avance III HD e Bruker Ascend 600 Avance NEO. I chemical shifts (δ) sono riportati in ppm rispetto alla TMS e alle costanti di accoppiamento (J) in Hz.

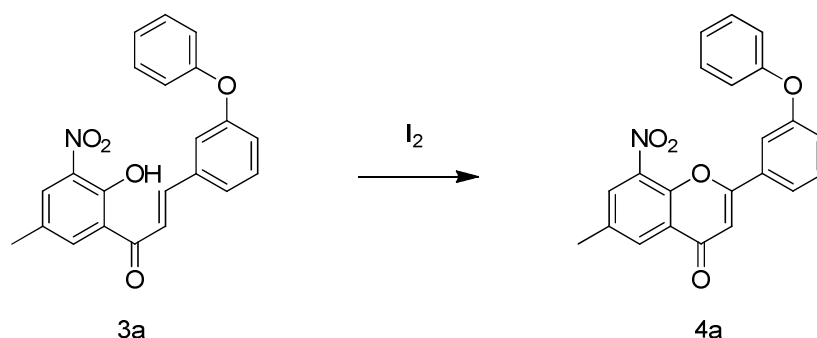
5.1.1 Sintesi di (E)-1-(2-idrossi-5-metil-3-nitrofenil)-3-(3-fenossifenil)prop-2-en-1-one

(3a)



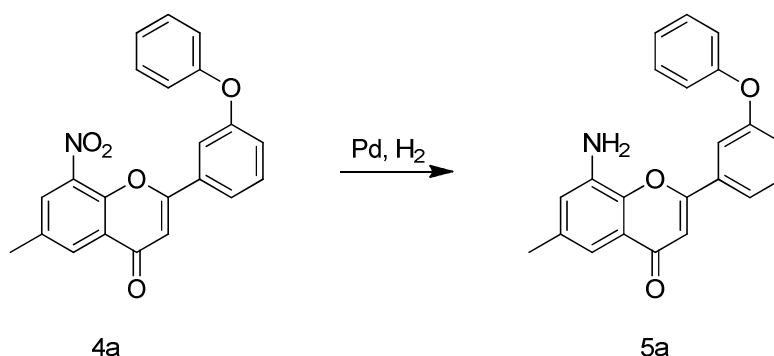
1-(2-idrossi-5-metil-3-nitrofenil)etanone (1a) (1 g, 5.12 mmol, 1 eq) è stato sciolto in metanolo ed aggiunto ad una soluzione acquosa di idrossido di sodio (840.5 mg, 41 mmol, 8eq). Raggiunto il completo scioglimento di 1a è stata aggiunta 3-fenossibenzaldeide (888 μ L, 1 eq) (2a). La reazione è stata mantenuta in agitazione per 16 h a 45 °C, poi raffreddata e acidificata a pH 5-6, aggiungendo una soluzione acquosa di HCl al 5%. Dopo estrazione con EtOAc, il grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (3% di etil acetato in cicloesano) per ottenere il composto 3a come solido giallo. (420 mg, Resa 41.5%), p.f: 119-122 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, TMS, ppm): δ 2.35 (s, 3H, CH₃), 6.98 – 7.02 (m, 2H, Ar-H), 7.06 (ddd, J = 8.2, 2.5, 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.10 – 7.15 (m, 1H, Ar-H), 7.33 – 7.42 (m, 2H, Ar-H), 7.46 (t, J = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.67 (dt, J = 7.7, 1.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.70 (t, J = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.83 (d, J = 15.5 Hz, 1H, CH), 7.97 (d, J = 15.6 Hz, 1H, CH), 8.05 (d, J = 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 8.39 (d, J = 1.4 Hz, 1H, Ar-H), 13.14 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, TMS, ppm): δ 19.95, 118.75, 120.00, 121.94, 122.97, 123.82, 123.97, 125.54, 128.82, 130.58, 131.07, 131.50, 136.81, 137.00, 138.16, 145.98, 153.49, 157.10, 157.31, 193.86. Calc. massa neutral per C₂₂H₁₇NO₅: 375,11067 Da. Calc. massa for C₂₂H₁₇NO₅+Na⁺: 398,09989 Da. HRMS: m/z = 376.1177 [M+1]⁺; 398.0994 [M+Na]⁺.

5.1.2 Sintesi di 6-metil-8-nitro-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-4-one (4a)



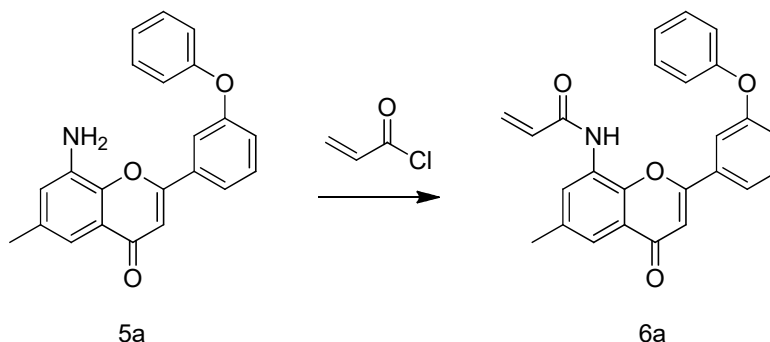
Il composto 3a (420 mg, 1.12 mmol) è stato sciolto in DMSO (8 mL), aggiungendo successivamente iodio (42 mg, 0.17 mmol). La reazione è stata mantenuta in agitazione per 6 h a 130 °C. La reazione è stata portata a temperatura ambiente per poi aggiungere una soluzione acquosa di NaHSO₃ allo 0.5% (50 mL). L'estrazione è stata condotta con CH₂Cl₂ (3 x 50 mL), lavando la fase organica con brine (100 mL) e anidrificando con Na₂SO₄. In seguito alla rimozione dei solventi il grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (cicloesano/etil acetato 1:1) per ottenere il composto 4a come solido bianco. Resa: 199 mg, 47.6%, p.f: 97-100.6 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25°C, TMS, ppm): δ 2.53 (s, 3H, CH₃), 6.81 (s, 1H, CH), 7.06 (dd, J = 8.7, 1.1 Hz, 2H, Ar-H), 7.15 – 7.20 (m, 2H, Ar-H), 7.35 – 7.42 (m, 2H, Ar-H), 7.48 (t, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.57 (t, J = 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.72 (ddd, J = 7.9, 1.8, 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.18 (d, J = 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 8.28 (d, J = 1.3 Hz, 1H, Ar-H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, 25°C, TMS, ppm): δ 20.77, 107.64, 116.01, 119.56, 121.07, 122.09, 124.26, 125.40, 130.06, 130.65, 130.84, 131.44, 132.27, 135.08, 138.28, 146.73, 156.06, 158.45, 163.00, 176.27. Calc. massa neutrale per for C₂₂H₁₅NO₅: 373,09502 Da. HRMS: *m/z*= 374.10116.

5.1.3 Sintesi di 8-ammino-6-metil-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-4-one (5a)



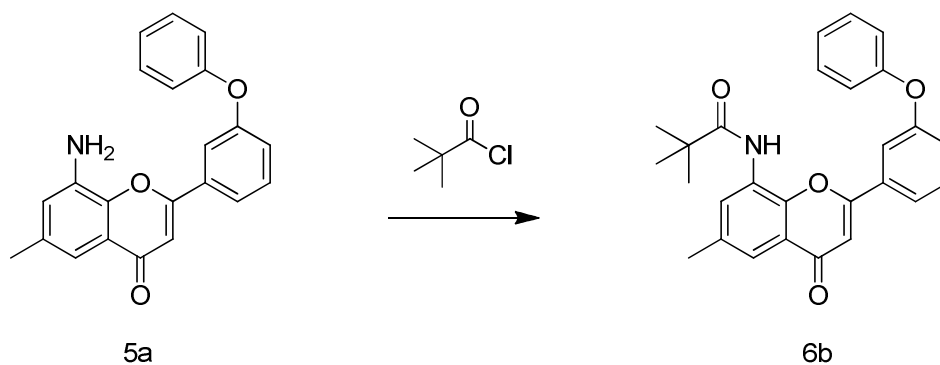
Il prodotto 5a è stato ottenuto tramite riduzione selettiva del nitro gruppo in ammino gruppo, catalizzata da palladio e H₂. Il composto 4a (168 mg, 0.45 mmol) è stato sciolto in CH₂Cl₂ (3 mL). Dopo aver aggiunto palladio su carbone (Pd/C) (25 mg, 0.24 mmol) la reazione è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente, in atmosfera di idrogeno, per 24 h. Il completamento della reazione è stato monitorato tramite cromatografia su strato sottile, il composto è poi stato filtrato su carta da filtro. Dopo rimozione dei solventi il grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (cicloesano/etil acetato 4:1) per ottenere il composto 5a come solido giallo. Resa: 78 mg, 47.9 %, p.f: 183.6 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25°C, TMS, ppm): 2.25 (s, 3H, CH₃), 5.65 (s, 2H, NH₂), 6.85 (dd, J = 2.1, 0.7 Hz, 1H, Ar-H), 6.91 (s, 1H, CH), 6.96 (dd, J = 2.1, 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.02 – 7.08 (m, 2H, Ar-H), 7.09 – 7.19 (m, 2H, Ar-H), 7.34 – 7.44 (m, 2H, Ar-H), 7.51 (t, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.91 (t, J = 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.97 (ddd, J = 7.9, 1.8, 0.9 Hz, 1H, Ar-H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 21.38, 107.37, 110.73, 117.63, 118.65, 119.11, 121.79, 122.28, 124.07, 124.14, 130.59, 131.11, 133.89, 135.30, 138.85, 143.00, 156.95, 157.59, 161.34, 177.99. Calc. massa neutrale per C₂₂H₁₇NO₃: 343,12084 Da. HRMS: *m/z*= 344.12764 [M+1]⁺.

5.1.4 Sintesi di N-(6-metil-4-osso-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-8-il)acrilammide (6a, FL30)



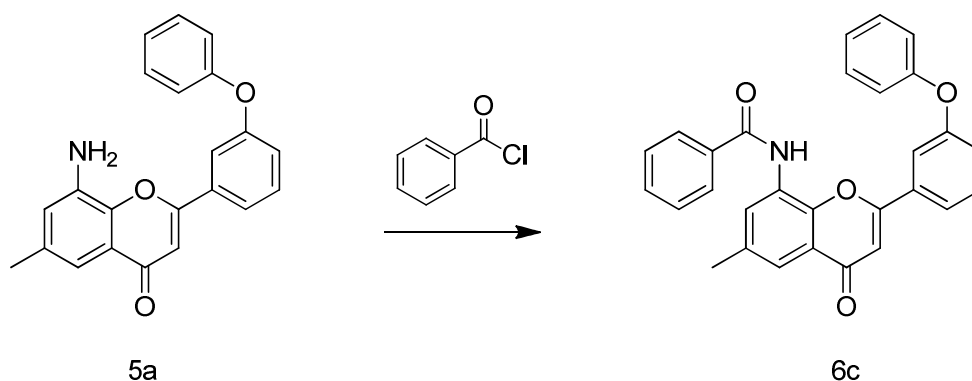
Al composto 5a, disciolto in CH_2Cl_2 (3 mL), è stata aggiunta trietilammina (3 eq), raffreddando a $0\text{ }^\circ\text{C}$. È poi stato aggiunto acriloloile cloruro (1 eq), lasciando la reazione in agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte. Al termine della reazione, l'estrazione è stata condotta con CH_2Cl_2 e, in seguito alla rimozione dei solventi, il grezzo è stato purificato tramite cromatografia su gel di silice (cicloesano/etil acetato 4:1), per ottenere il composto 6a come solido rosa chiaro. Resa: 45 mg, 77.6%. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25°C , ppm): δ 2.44 (s, 3H, CH_3), 5.80 (dd, $J = 10.2, 1.9$ Hz, 1H, CH_2), 6.28 (dd, $J = 17.1, 1.9$ Hz, 1H, CH_2), 6.52 (dd, $J = 17.0, 10.2$ Hz, 1H, CH), 7.06 (s, 1H, CH), 7.08 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar-H), 7.18 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, Ar-H), 7.22 (dd, $J = 8.3, 2.6$ Hz, 1H, Ar-H), 7.41 – 7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.58 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.68 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, Ar-H), 7.83 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, Ar-H), 7.88 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, Ar-H), 7.91 (dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 1H, Ar-H), 10.16 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25°C , ppm): δ 21.12, 107.92, 117.52, 119.14, 121.11, 122.31, 124.09, 124.25, 127.55, 127.98, 130.63, 130.66, 131.24, 131.67, 133.69, 135.11, 147.48, 156.88, 157.64, 161.86, 164.13, 177.32. Calc. massa neutrale per $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{NO}_4$: 397,13141 Da. HRMS: $m/z = 398.13812$ $[\text{M}+1]^+$.

5.1.5 Sintesi di N-(6-metil-4-osso-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-8-il)pivalammide (6b, FL33)



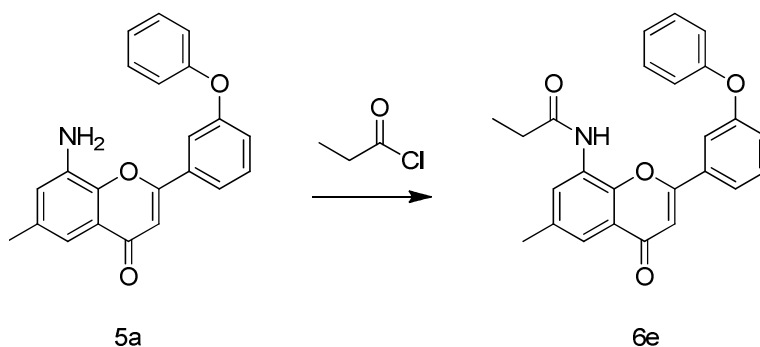
La sintesi è stata condotta con la stessa procedura utilizzata per ottenere il prodotto 6a, utilizzando 2 eq di trietilammina e aggiungendo cloruro di pivaloile (1.2 eq), per ottenere il composto 6b come solido arancione. Resa: 38 mg, 55.6 %, p.f: 171.8-173.3 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, ppm): δ 1.22 (s, 9H, CH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃), 7.01 – 7.04 (m, 2H, Ar-H), 7.06 (s, 1H, CH), 7.16 (tt, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.22 (ddd, *J* = 8.1, 2.5, 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.39 – 7.43 (m, 2H, Ar-H), 7.59 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.63 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.69 (dd, *J* = 2.3, 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.80 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.89 (ddd, *J* = 7.9, 1.8, 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 9.43 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, TMS, ppm): δ 21.00, 27.67, 39.27, 107.83, 118.03, 118.57, 121.43, 122.47, 122.76, 123.99, 124.04, 128.14, 130.62, 131.32, 132.31, 134.00, 135.01, 148.52, 157.28, 157.29, 161.70, 177.11, 177.47. Calc. massa neutrale per C₂₇H₂₅NO₄: 427.17836 Da. Calc. massa per C₂₇H₂₅NO₄ +Na⁺: 450,16758 Da. HRMS: *m/z*= 428.11638 [M+1]⁺; 450.16888 [M+Na]⁺.

5.1.6 Sintesi di N-(6-metil-4-osso-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-8-il)benzammide (6c, FL32)



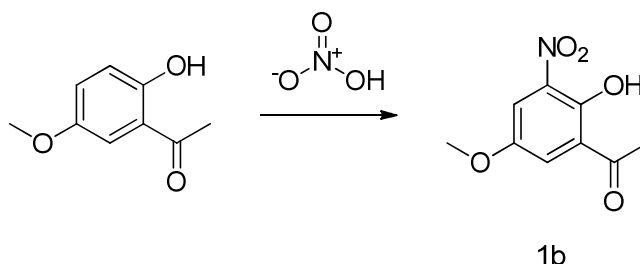
La sintesi è stata condotta con la stessa procedura utilizzata per ottenere il prodotto 6a, utilizzando 2.5 eq di trietilammina e aggiungendo cloruro di benzile (1.5 eq), per ottenere il composto 6c come solido arancione. Resa: 41 mg, 54 %, p.f: 175 °C, dec. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, ppm): δ 2.43 (s, 3H, CH₃), 6.93 – 6.97 (m, 2H), 7.03 (s, 1H, CH), 7.07 – 7.12 (m, 1H, Ar-H), 7.12 – 7.15 (m, 1H, Ar-H), 7.29 – 7.35 (m, 2H, Ar-H), 7.43 – 7.51 (m, 3H, Ar-H), 7.54 – 7.60 (m, 1H, Ar-H), 7.71 (dd, J = 2.2, 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.76 – 7.78 (m, 1H, Ar-H), 7.79 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.80 – 7.83 (m, 1H, Ar-H), 7.96 (d, J = 1.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.98 (d, J = 1.2 Hz, 1H, Ar-H), 10.40 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, ppm): δ 20.59, 107.39, 117.47, 118.18, 121.33, 121.84, 122.04, 123.54, 123.66, 127.40, 127.63, 128.53, 130.08, 130.80, 131.72, 131.90, 133.44, 133.91, 134.69, 148.07, 156.59, 156.86, 161.31, 165.64, 176.94. Calc. massa neutrale per C₂₉H₂₁NO₄: 447.14706 Da. Calc. massa per C₂₉H₂₁NO₄ +Na⁺: 470,13628 Da. HRMS: *m/z*= 448.1538 [M+1]⁺, 470.1361 [M+Na]⁺.

5.1.7 Sintesi di N-(6-metil-4-osso-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-8-il)propionammide (6e, FL29)



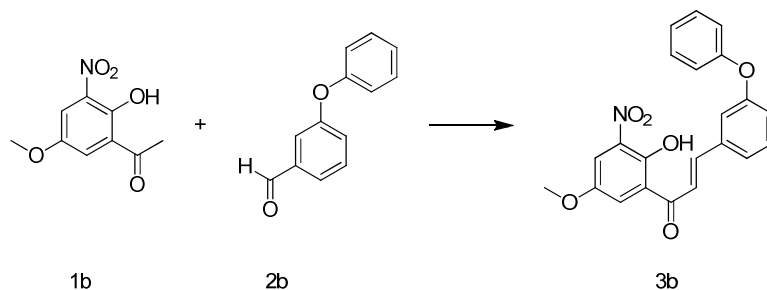
La sintesi è stata condotta con la stessa procedura utilizzata per ottenere il prodotto 6a, utilizzando 2 eq di trietilammina e aggiungendo propionil cloruro (1.2 eq), per ottenere il composto 6e come solido giallo chiaro. Resa: 10 mg, 62.5%. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, ppm): δ 1.08 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 2.32 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H), 7.06 (s, 1H), 7.06 – 7.09 (m, 2H), 7.16 – 7.20 (m, 1H), 7.22 (dd, *J* = 8.1, 2.5 Hz, 1H), 7.59 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.83 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.92 (dd, *J* = 7.3, 1.6 Hz, 1H), 9.88 (s, 1H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, ppm): δ 10.15, 21.10, 29.51, 107.83, 117.53, 119.02, 120.85, 122.38, 122.43, 124.03, 124.19, 127.87, 130.65, 130.90, 131.31, 133.74, 135.07, 147.59, 156.94, 157.54, 161.76, 172.77, 177.42. Calc. massa neutrale per C₂₅H₂₁NO₄: 399,14706 Da. Calc. massa per C₂₅H₂₁NO₄Na⁺: 422,13628 Da. HRMS: *m/z* = 400.15400 [M+1]⁺.

5.1.8 Sintesi di 1-(2-idrossi-5-metossi-3-nitrofenil)etanone (1b)



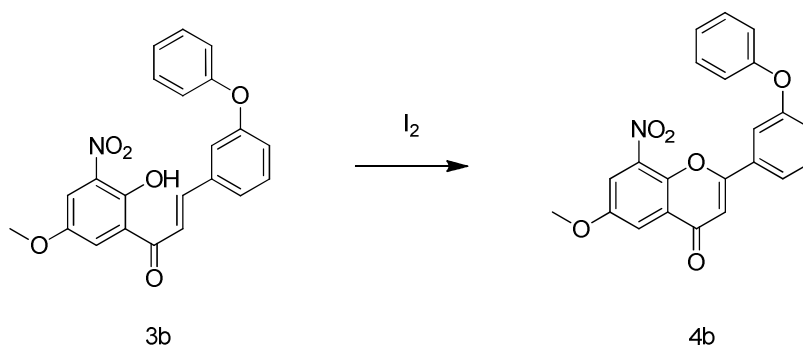
1-(2-idrossi-5-metossifenil)etanone (500 mg, 4.3 mmol, 1 eq) è stato sospeso in acido acetico (1 mL), aggiungendo poi acqua deionizzata (300 μ L). Nella miscela è stato gocciolato acido nitrico (256 μ L, 6.4 mmol, 1.5 eq) e la reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 2 h. Dopo aver estratto con etil acetato sono stati eliminati i solventi ed il grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (cicloesano/etil acetato 5:1) per ottenere il prodotto 1b come solido giallo. Resa: 450 mg, 70.7 %, p.f: 119.6-112 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, TMS, ppm): δ 2.76 (s, 3H, CH₃), 3.89 (s, 3H, CH₃), 7.80 (d, J = 3.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.85 (d, J = 3.2 Hz, 1H, Ar-H), 12.29 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, TMS, ppm): δ 28.85, 56.84, 116.18, 122.86, 124.25, 138.60, 148.26, 150.82, 204.40. Calc. massa neutrale per C₉H₉NO₅: 211.04807 Da. HRMS: m/z =210.04059 [M+1]⁺.

5.1.9 Sintesi di (E)-1-(2-idrossi-5-metossi-3-nitrofenil)-3-(3-fenossifenil)prop-2-en-1-one (3b)



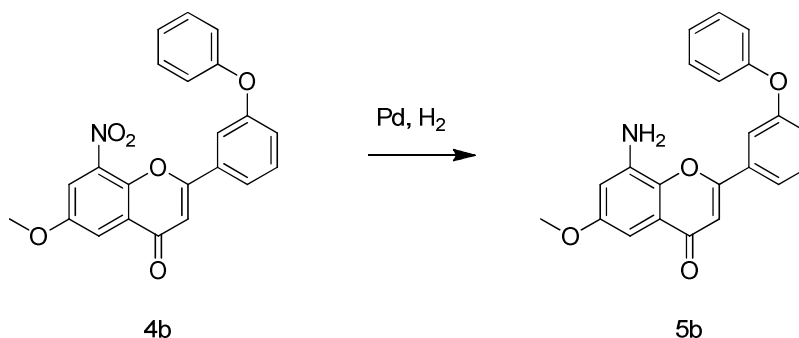
Una soluzione di idrossido di potassio (654.4 mg, 11.7 mmol, 5.5 eq) in metanolo (2 mL) è stata aggiunta a 1-(2-idrossi-5-metossi-3-nitrofenil)etenone (1b) (450 mg, 2.1 mmol, 1 eq) disciolto in metanolo. Una volta sciolto completamente 1b è stata aggiunta 3-fenossibenzaldeide (370 μ L, 1 eq), lasciando la reazione in agitazione a 45 °C per 24 h. La reazione è stata poi acidificata a pH 5-6 aggiungendo una soluzione acquosa di HCl al 5%. Dopo estrazione con EtOAc e rimozione dei solventi il grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (4% di etil acetato in cicloesano) per ottenere il prodotto 3b come solido giallo. Resa: 200 mg, 24%, p.f: 117.1-117.9 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, TMS, ppm): δ 3.87 (s, 3H, OCH₃), 7.04 (dd, J = 8.7, 1.1 Hz, 2H, Ar-H), 7.10 (ddd, J = 8.2, 2.5, 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 – 7.20 (m, 1H, Ar-H), 7.39 – 7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.50 (t, J = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.71 (d, J = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.72 – 7.74 (m, 1H, Ar-H), 7.80 – 7.86 (m, 2H, Ar-H, CH), 7.93 (d, J = 15.6 Hz, 1H, CH), 8.03 (d, J = 3.2 Hz, 1H, Ar-H), 12.46 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, TMS, ppm): δ 56.96, 115.45, 118.83, 120.02, 121.94, 122.84, 123.84, 124.01, 125.51, 125.93, 130.61, 131.10, 136.86, 138.53, 146.00, 148.90, 151.08, 157.12, 157.36, 193.36. Calc. massa neutrale per C₂₂H₁₇NO₆: 391,10559 Da. Calc. massa per C₂₂H₁₇NO₆ + Na⁺: 414,09481 Da. HRMS: m/z = 392.11342 [M+1]⁺.

5.1.10 Sintesi di 6-metossi-8-nitro-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-4-one (4b)



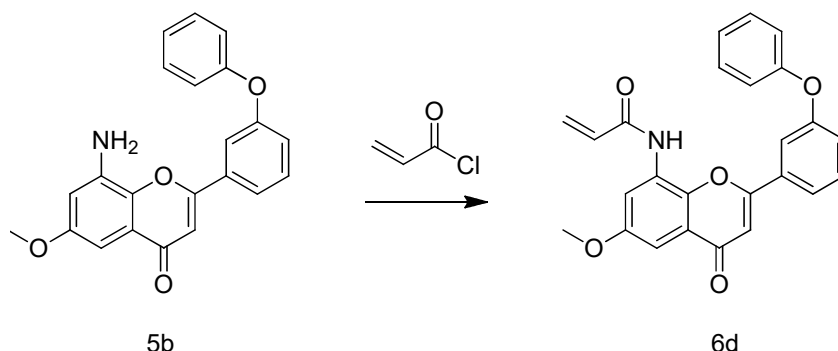
Ad una soluzione di 3b (180 mg, 0.46 mmol) in DMSO è stato aggiunto iodio (25 mg, 0.1 mmol), lasciando la reazione in agitazione a 130 °C per 6 h. Dopo averla raffreddata a temperatura ambiente, alla reazione è stata aggiunta una soluzione acquosa allo 0.5% di NaHSO₃ (50 mL). In seguito ad estrazione con CH₂Cl₂ (3 x 50 mL) la fase organica è stata lavata con brine (100 mL) e anidrificata con Na₂SO₄. I solventi volatili sono stati rimossi a pressione ridotta, ottenendo un prodotto grezzo che è stato purificato tramite cromatografia su gel di silice (cicloesano/etil acetato 1:1) per ottenere il composto 4b come solido giallo. Resa: 113 mg, 63%, p.f: 168.6-169.5 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 25°C, TMS, ppm): δ 4.02 (s, 3H, OCH₃), 7.13 – 7.19 (m, 2H, Ar-H), 7.24 – 7.31 (m, 3H, Ar-H, CH), 7.47 – 7.54 (m, 2H, Ar-H), 7.67 (t, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.82 – 7.87 (m, 2H, Ar-H), 7.95 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 8.18 (d, J = 3.2 Hz, 1H, Ar-H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆, 25°C, TMS, ppm): δ 57.06, 107.39, 112.62, 116.90, 118.89, 119.42, 121.96, 122.42, 124.51, 126.27, 130.72, 131.49, 132.98, 139.61, 142.82, 155.62, 156.53, 157.90, 162.09, 175.78. Calc. massa neutrale per C₂₂H₁₅NO₆: 389,08994 Da. Calc. massa for C₂₂H₁₅NO₆ +Na⁺: 412,07916 Da. HRMS: *m/z*= 390.09790 [M+1]⁺.

5.1.11 Sintesi di 8-ammino-6-metossi-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-one (5b)



Il composto 5b è stato ottenuto grazie alla riduzione selettiva del nitro gruppo in ammino gruppo, catalizzata da Palladio ed H₂. Il composto 4b (113 mg, 0.29 mmol) è stato disciolto in CH₂Cl₂ (3 mL), ed alla soluzione è stato aggiunto Palladio su carbone (Pd/C) (17 mg, 0.16 mmol). La reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 h in atmosfera di idrogeno. Il completamento della reazione è stato monitorato tramite cromatografia su strato sottile, il composto è poi stato filtrato su carta da filtro. Dopo rimozione dei solventi il grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (cicloesano/etil acetato 4:1) per ottenere il composto 5b come solido giallo. Resa: 69 mg, 65.5%, p.f: 179.3-180 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, TMS, ppm): δ 3.77 (s, 3H, OCH₃), 5.84 (s, 2H, NH₂), 6.64 (d, J = 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.65 (d, J = 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.97 (s, 1H, CH), 7.08 (dd, J = 8.7, 1.1 Hz, 2H, Ar-H), 7.15 (dd, J = 8.2, 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.18 (tt, J = 7.4, 1.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.43 (dd, J = 8.6, 7.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.55 (t, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.96 (t, J = 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 8.01 (d, J = 7.9 Hz, 1H, Ar-H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, TMS, ppm): δ 55.68, 91.92, 105.60, 106.87, 117.69, 119.13, 121.81, 122.29, 124.16, 124.92, 130.62, 131.13, 133.90, 140.40, 140.55, 157.01, 157.53, 157.61, 161.22, 177.76. Calc. massa neutrale per C₂₂H₁₇NO₄: 359,11576 Da. Calc. massa per C₂₂H₁₇NO₄ +Na⁺: 382,10498 Da. HRMS: *m/z*= 360.12343 [M+1]⁺.

5.1.12 Sintesi di N-(6-metil-4-osso-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-8-il)acrilammide (6d, FL31)



Al composto 5b, disciolto in CH₂Cl₂ (3 mL), è stata aggiunta trietilammina (2.5 eq), raffreddando a 0 °C. È poi stato aggiunto acriloloile cloruro (1.5 eq), lasciando la reazione in agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte. Al termine della reazione, l'estrazione è stata condotta con CH₂Cl₂ e, in seguito alla rimozione dei solventi, il grezzo è stato purificato tramite cromatografia su gel di silice (cicloesano/etil acetato 4:1), per ottenere il composto 6d come solido giallo. Resa: 15 mg, 55.6%, p.f: 171.8-173.3 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, ppm): δ 3.88 (s, 3H, CH₃), 5.83 (dd, J = 10.2, 1.8 Hz, 1H, CH₂), 6.30 (dd, J = 17.0, 1.8 Hz, 1H, CH₂), 6.53 (dd, J = 17.0, 10.2 Hz, 1H, CH), 7.08 (s, 1H, CH), 7.08 – 7.11 (m, 2H, Ar-H), 7.19 (tt, J = 7.4, 1.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.22 (ddd, J = 8.2, 2.5, 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.28 (d, J = 3.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.40 – 7.47 (m, 2H, Ar-H), 7.58 (t, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.75 (d, J = 3.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.79 – 7.87 (m, 1H, Ar-H), 7.92 (ddd, J = 7.9, 1.7, 0.9 Hz, 1H), 10.21 (s, 1H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆, 25°C, ppm): δ 56.27, 101.63, 107.37, 117.48, 117.89, 119.21, 122.25, 122.33, 124.29, 124.83, 128.36, 129.15, 130.65, 131.25, 131.63, 133.64, 143.89, 156.44, 156.81, 157.65, 161.77, 164.15, 177.05. Calc. massa neutrale per C₂₅H₁₉NO₅: 413.12632 Da. Calc. massa per C₂₅H₁₉NO₅ +Na⁺: 436,11554 Da. HRMS: m/z= 414.13366 [M+1]⁺ .

5.2 Saggio di inibizione enzimatica

Per valutare l'attività e l'inibizione della proteina chinasi è stato utilizzato un saggio continuo a fluorescenza basato sulla tecnologia PhosphoSens (Assay Quant). Il saggio si basa sull'utilizzo del peptide substrato AQT0734 (Assay Quant), contenente un fluoroforo (Sox). In presenza di attività chinasi si assiste alla fosforilazione di uno specifico gruppo ossidrilico del peptide substrato, posizionato ad una distanza opportuna dal fluoroforo. Sfruttando il fenomeno della fluorescenza potenziata dalla chelazione (ChEF), a seguito della coordinazione di uno ione Mg^{2+} tra il gruppo fosfato aggiunto e il fluoroforo si osserva un'emissione a 480 nm, in seguito ad eccitazione a 360 nm. L'intensità della fluorescenza misurata risulta proporzionale all'attività chinasi.

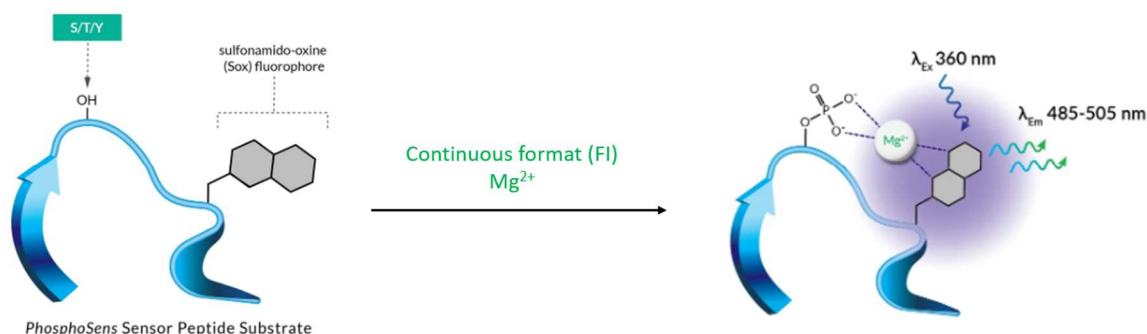


Figura 12. Meccanismo di funzionamento del saggio di inibizione enzimatica PhosphoSens per la determinazione dell'attività chinasi

La determinazione dell'IC₅₀ per l'EGFR mutante L858R/T790M e per il wild-type è stata eseguita a 30 °C con una concentrazione 0.1 μM di enzima e 10 μM di peptide substrato AQT0734 (Assay Quant). Sulla base di una precedente valutazione della K_m dell'ATP per LT-EGFR, è stata utilizzata una concentrazione 0.1 mM di ATP, circa il doppio del valore

di K_m . Sono state utilizzate concentrazioni di inibitore da 0.03 μM a 10 μM . Il volume totale di reazione del saggio, pari a 25 μL e portato a pH 7.5, comprendeva HEPES 50 mM, NaCl 20 mM, MgCl_2 10 mM, BSA 0.1 mg/mL, 1% DMSO e DTT 2 mM. I componenti sono stati dispensati in una micropiastra da 384 pozzetti (Corning 3572). Le reazioni sono state avviate aggiungendo ATP, dopo un periodo di incubazione di 5 minuti. L'accumulo del peptide fosforilato è stato monitorato tramite un lettore di piastre Synergy HT (Biotek) dotato di un modulo di intensità di fluorescenza con eccitazione a 360 nm ed emissione a 480 nm. Per il test di inibizione dipendente dal tempo il periodo di preincubazione è stato esteso a 45 minuti.

5.3 Colture cellulari

Le linee cellulari umane di carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) sono state tutte ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC). La linea cellulare H1975 (CRL-5908TM) è stata coltivata in terreno RPMI 1640 (SIAL-RPMI-XA); la linea di NSCLC A549 (CCL-185TM), le cellule di tumore al seno MCF7 e i fibroblasti umani del derma (HDF) sono state coltivate in terreno DMEM completo (SIAL-DMEM-HPXA) supplementato con FBS 10%, L-glutamina 2mM, penicillina 100 U/mL, e streptomina 100 $\mu\text{g/mL}$. Tutte le colture sono state mantenute in fiasche da 75 cm^2 , in incubatore a 37 °C, 5% di CO_2 e umidità relativa del 95%. Le colture cellulari sono state staccate dal substrato di coltura tramite il trattamento con 0.5% di tripsina in PBS (pH, 7.4) contenente uno 0.025% di EDTA. Tutti i reagenti per le colture sono stati forniti dalla SIAL (Roma, Italia).

5.4 Studio della tossicità mediante saggio XTT

Il saggio colorimetrico XTT è una metodologia consolidata e ampiamente utilizzata nella valutazione della vitalità e della proliferazione cellulare in colture in vitro, grazie alla sua capacità di identificare la presenza di attività cellulare [21]. Durante il saggio, il sale di tetrazolo XTT (2,3-bis(2-metossi-4-nitro-5-solfofenil)-5-[(fenilammino)-carbonil]-2H-tetrazolio) viene ridotto a formazano da parte delle deidrogenasi cellulari espresse nelle cellule metabolicamente attive. Il formazano è un colorante viola, solubile nei mezzi acquosi, che consente una misurazione diretta dell'assorbanza a 450 nm tramite spettrofotometro. L'efficienza della reazione di riduzione di XTT da parte delle cellule è migliorata significativamente dalla presenza di un reagente di accoppiamento elettronico, come il PMS (fenazina metosolfato). Un valore di assorbanza maggiore è indice di una maggiore attività metabolica e quindi di una maggiore vitalità cellulare.

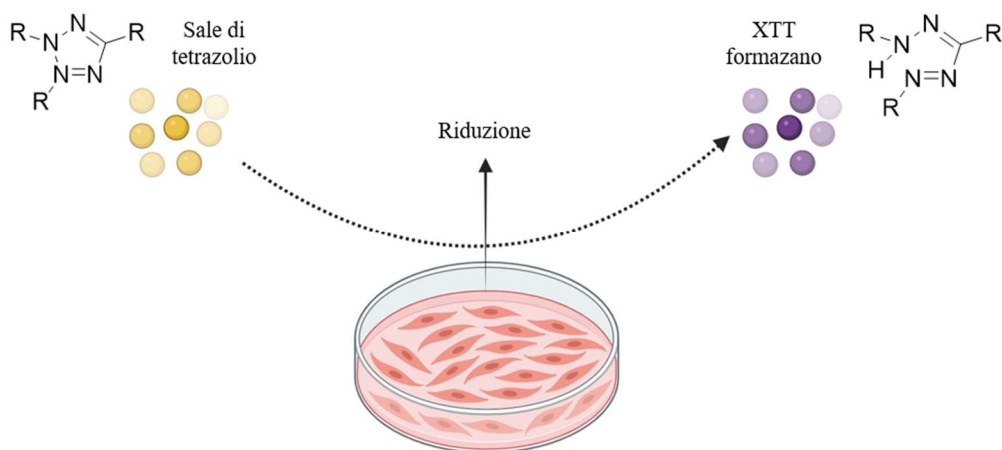


Figura 13. Riduzione dell'XTT a formazano (viola) da parte delle deidrogenasi cellulari

Il kit II per la proliferazione cellulare (XTT) è stato utilizzato secondo le specifiche fornite dal produttore. Le cellule H1975, A549, HDF e MCF7 sono state seminate in multi-well da 96 pozzetti, ad una concentrazione di 3×10^5 cellule per pozzetto, per raggiungere una confluenza del 60% dopo 24 h. A ciascun pozzetto sono poi stati aggiunti 200 μL di composto in terreno completo a diverse concentrazioni. Dopo incubazione per 72 h a 37 °C con 5% di CO_2 è stato rimosso il sopranatante da ciascun pozzetto, sostituendolo con 100 μL di terreno completo fresco. È poi stato preparato il mix contenente il reagente di marcatura e il reagente elettronico, e aggiunto 50 μL di questo mix a ciascun pozzetto. Dopo incubazione per 4 h a 37 °C con 5% di CO_2 , la lettura è stata eseguita con uno spettrofotometro (Biotek Synergy HT MicroPlate Reader Spectrophotometer) ad una lunghezza d'onda di 450 nm. La densità ottica nel gruppo di controllo (cellule non trattate) è stata considerata come il 100% di vitalità. La vitalità cellulare relativa (%) è stata calcolata come segue:

$$\frac{A_{450 \text{ nm dei campioni trattati}}}{A_{540 \text{ nm dei campioni non trattati}}} \times 100$$

Ciascun esperimento è stato effettuato tre volte in triplicato.

5.5 Citometria a flusso

La quantificazione dei livelli di EGFR fosforilato all'interno delle cellule, è stata condotta mediante citometria a flusso. Le cellule A549 e H1975 sono state seminate in flask da 25 cm^2 per raggiungere dopo 24 ore una confluenza del 60%. Per l'induzione della fosforilazione dell'EGFR, le cellule A549 sono state incubate per 10 minuti con 50 ng/mL

di EGF ricombinante (Euroclone), prima del trattamento con FL4 e FL30 per 4 e 24 ore. Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate con un tampone PBS (pH 7.4) contenente ortovanadato di sodio Na_3VO_4 e (1 mM) fluoruro di sodio NaF (1 mM) per inibire l'attività fosfatase. Le cellule sono state quindi distaccate mediante tripsinizzazione e lavate in PBS. Successivamente, è stata eseguita la fissazione cellulare in paraformaldeide al 2%, seguita da permeabilizzazione per 30 minuti in ghiaccio con PBS, BSA allo 0.5%, Triton X100 allo 0.025% e colorazione tramite anticorpi diretti contro EGFR (Invitrogen, MA5-28104) e fosfo-EGFR (Y1068) (R&D System, IC3570F). Dopo incubazione al buio per 1 h a 4 °C, sono state misurate almeno 5000 cellule per ogni campione utilizzando le stesse impostazioni. Per inibire la potenziale attività delle fosfatasi i buffer di colorazione e permeabilizzazione sono stati integrati con gli inibitori delle fosfatasi. La percentuale di fosforilazione dell'EGFR è stata calcolata dividendo l'intensità media della fluorescenza dell'EGFR fosforilato per l'intensità media della fluorescenza dell'EGFR non fosforilato.

Capitolo VI

RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1 Progettazione di nuovi TKIs utilizzando come scaffold il nitroflavone FL4

Studi *in silico* precedentemente effettuati e descritti nel paragrafo 4.3 hanno permesso di identificare il composto FL4, in grado di inibire le forme mutanti di EGFR a basse concentrazioni micromolari, con un'elevata specificità rispetto al wild-type. Esso rappresenta dunque un ottimo punto di partenza per la sintesi di analoghi strutturalmente simili con efficacia a livello nanomolare ed aumentata selettività per le forme mutate dell'EGFR.

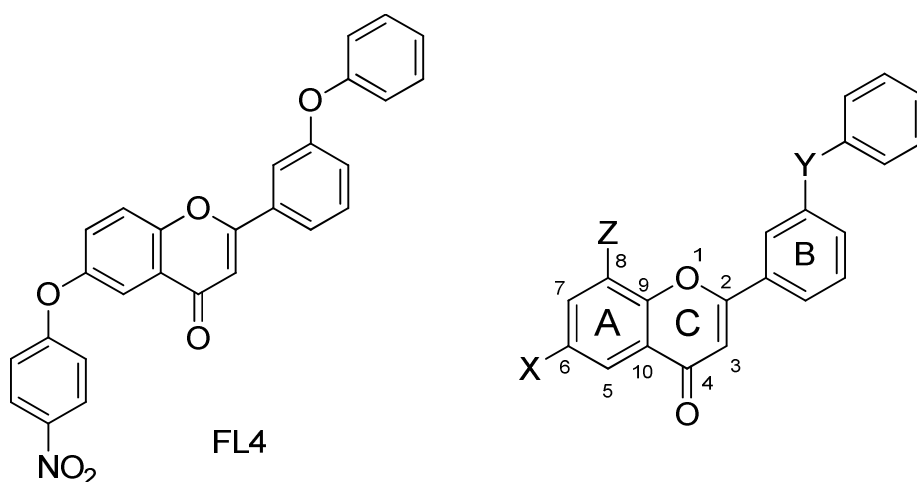


Figura 14. Struttura del composto FL4 (a sinistra) e scaffold di partenza per gli esperimenti di docking (a destra)

La progettazione dei nuovi derivati flavonici è stata effettuata partendo dal complesso EGFR-LT-FL4, seguendo lo stesso razionale utilizzato per l'identificazione di FL4. In particolare, sono stati dapprima generati numerosi analoghi strutturali, attraverso la sostituzione di specifici gruppi funzionali in determinate posizioni dello scaffold flavonico, indicate in **figura 14** con le lettere X, Z e Y. L'interazione di ciascun composto ideato con la tasca di legame dell'ATP dell'EGFR wild-type e del mutante L858R/T790M (LT-EGFR) è stata valutata attraverso esperimenti di docking, andando a determinare l'energia libera di legame di ciascuna di queste. L'energia libera di legame è data dalla somma delle energie libere intramolecolari e torsionali e, essendo direttamente correlata alla costante di inibizione K_i ($\Delta G = -RT \ln K_i$) ha permesso di identificare le molecole che mostravano affinità maggiore per il recettore, con K_i inferiore, permettendo quindi di progettare, di volta in volta, modifiche chimiche mirate. Questo approccio non solo accelera il processo di scoperta di nuovi farmaci, ma offre anche la possibilità di sviluppare molecole con profili di attività desiderati, aumentando il potenziale terapeutico degli analoghi strutturali creati. L'analisi dei binding mode delle conformazioni più popolate, ad energia inferiore, è stata effettuata alla luce di tre principali criteri di selezione:

- Interazione con gli amminoacidi mutati R858 e M790
- Capacità di formare un legame idrogeno bidentato con la regione hinge
- Energia di legame inferiore a -9 kcal/mol

L'interazione con gli amminoacidi mutati è fondamentale per ottenere inibitori selettivi nei confronti dell'LT-EGFR rispetto al wild-type, in modo tale da ridurre al minimo potenziali effetti collaterali nei pazienti durante la terapia. La capacità di formare un legame idrogeno bidentato con la regione hinge serve invece a garantire l'efficacia di questi inibitori; è infatti

importante che questi siano in grado di ancorarsi alla tasca di legame in modo analogo all'ATP, potendo competere con essa. In ultimo, un'energia di legame bassa permette di selezionare molecole con un'elevata affinità per il recettore, potenzialmente nell'ordine del nanomolare.

Primariamente le modifiche strutturali effettuate partendo da FL4, si sono concentrate sull'anello A della struttura flavonica: questo svolge infatti un ruolo fondamentale nell'interazione con la regione hinge tramite un legame idrogeno bidentato e con il residuo mutato M790 tramite un'interazione π -zolfo.

Come prima cosa si è osservato che la sostituzione dell'O-spacer con un'ammina (-NH), sia sull'anello A (FL6) che sull'anello B (FL7), porta ad una significativa riduzione dell'affinità per LT-EGFR rispetto a FL4. Un effetto simile si ottiene andando a sostituire il gruppo fenossico con un fenossico-metil benzene (FL9) o spostando il gruppo -NO₂ dalla posizione in *para* a quella in *meta*. In tutti questi casi, come si può osservare dalla **figura 17B**, le modifiche strutturali applicate portano il gruppo -NO₂ fuori dalla tasca di legame, nella regione esposta al solvente, causando una perdita delle interazioni con la regione hinge.

Nel composto FL10 (**Figura 17C**) il gruppo -NO₂, posizionato in *orto* sul fenossico, promuove la formazione di interazioni π tra l'anello B ed i residui mutati R858 e M790. Il sistema eteroaromatico planare è ancorato al residuo M793 della regione hinge; tuttavia, va a formare con essa un solo legame idrogeno al posto di quello bidentato atteso. Inoltre, una porzione significativa della molecola fuoriesce dalla tasca, estendendosi nella regione esposta al solvente.

Mantenendo il gruppo -NO₂ in *orto* e aggiungendo in posizione *para* del fenossico dei gruppi elettron-attrattori e donatori, come -OCH₃ (FL11), -CN (FL12) o -CH₃ (FL13), il gruppo

nitrofenossi rimane sempre esposto al solvente, evidentemente a causa della mancata possibilità da parte di questo di formare delle interazioni significative.

Una sostituzione potenzialmente promettente è la sostituzione del gruppo nitro (-NO₂) con un gruppo carbossilico (FL14): a pH fisiologico il gruppo -COOH è infatti deprotonato ed i due ossigeni sono in grado di fungere da accettori di legami idrogeno. Questa sostituzione ha effettivamente portato ad un aumento dell'affinità per LT-EGFR rispetto a FL4 ma, nonostante questo, il gruppo carbossilico non è in grado di formare il legame idrogeno bidentato con la regione hinge e non promuove neppure la formazione di interazioni con i due amminoacidi mutati (**Figura 17D**). La sostituzione di -COOH con dei bioisosteri (effetti sterici ed elettronici simili, stessa pKa e stesso logP) come il gruppo sulfonamide (FL15), benzofurazano (FL16), benzonitrile (FL17) ha portato ad un leggero miglioramento del binding all'interno della tasca, promuovendo delle interazioni con la regione hinge. Tuttavia, risulta ancora mancante un'interazione con i residui mutati e l'affinità di binding è più bassa nell'LT-EGFR, forse proprio a causa delle mutazioni che potrebbero alterare l'accessibilità al sito (**Figura 17D**).

I gruppi ammidici sono molto utilizzati nel drug design in quanto permettono di ottimizzare numerosi agenti terapeutici permettendo di modularne la solubilità, lipofilità e la flessibilità conformazionale, in modo da migliorare il binding all'interno del sito di legame dello specifico target [22]. Proprio per queste loro potenzialità sono già presenti in numerosi farmaci attualmente in commercio [23]. Inoltre, la presenza di un ossigeno carbonilico e di un idrogeno ammidico potrebbe promuovere la formazione del legame idrogeno bidentato con la regione hinge. Per queste motivazioni il gruppo -NO₂, coinvolto nella formazione di legami idrogeno con la regione hinge, è stato sostituito con diversi gruppi ammidici: acetammide (FL21), proprionammide (FL22), nitrobenzammide (FL23) e acrilammide

(FL24) (**Figura 17E**). Nonostante nessuno di questi composti rispetti tutti i requisiti richiesti, la molecola FL23 si è rivelata particolarmente interessante: la nitrobenzammide promuove infatti un'interazione con il residuo mutato R858, mentre il gruppo fenossi, legato all'anello B, è coinvolto in un'interazione π -alchile con M790. Pur mancando la formazione di un legame idrogeno bidentato con la regione hinge queste particolari interazioni fanno sì che la molecola si disponga in una caratteristica conformazione a forma di U, evidenziata nel riquadro in **figura 17E**, rivelatasi promettente nel design di inibitori tirosin-chinasici [24]. I risultati più promettenti sono stati ottenuti spostando l'attenzione sulla posizione C8 dello scaffold flavonico, dove l'aggiunta di gruppi ammidici ha portato alle ottimizzazioni strutturali migliori, con composti in grado di adottare la conformazione ad U all'interno della tasca di legame e di soddisfare tutti i criteri posti.

Nel composto FL27 è stato utilizzato come sostituente legato al carbonio C8 un gruppo acetammidico, rivelatosi in grado di interagire specificamente con i due residui mutanti (R858, M790). Nonostante il gruppo ammidico formasse un solo legame idrogeno con la regione hinge, al posto del legame bidentato atteso, la sua modalità di binding particolarmente promettente lo ha reso un ottimo punto di partenza per un'ulteriore ottimizzazione graduale. All'interno della tasca di legame, l'anello A è stabilizzato da interazioni idrofobiche di tipo π -CH con la leucina 722; l'aggiunta di un gruppo elettron-donatore sull'anello A, in posizione *meta* rispetto al gruppo ammidico, permette di aumentare la densità elettronica dell'anello aromatico, portando in ultimo ad un potenziale rafforzamento di queste interazioni (**Figura 15**).

Nella molecola FL28 il carbonio C6 è stato legato ad un gruppo metilico: grazie al suo effetto elettron-donatore induttivo questo ha permesso di rafforzare l'interazione idrofobica dell'anello A tramite un'interazione aggiuntiva con il residuo L722, senza andare però ad

alterare la conformazione della molecola all'interno della tasca di legame e mantenendo quindi le altre interazioni presenti (**Figura 15**).

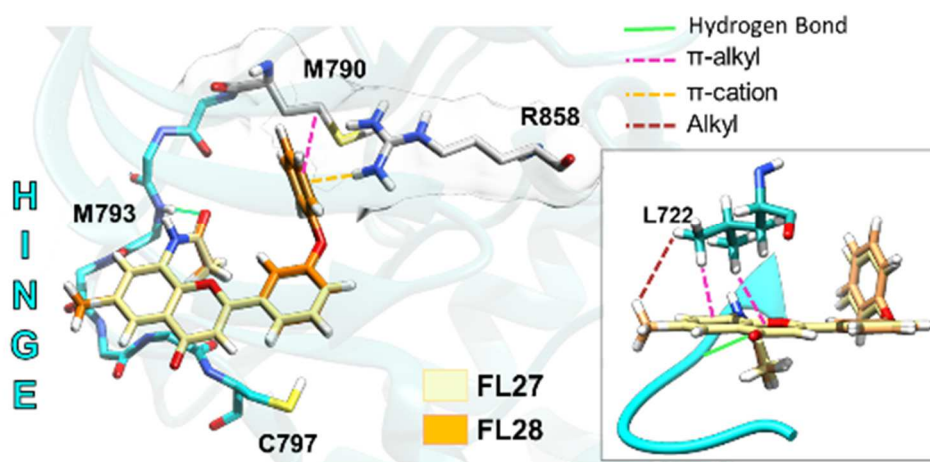


Figura 15. Sovrapposizione delle pose di binding di FL27 (giallo chiaro) e FL28 (arancione) con focus sulle interazioni tra l'anello A e L722

Il passo successivo è stato quello di tentare di mantenere i progressi raggiunti, cercando però di ottenere anche la formazione di un legame idrogeno bidentato con la regione hinge. La sostituzione della acetammide con una propionammide (FL29), grazie all'introduzione di un ulteriore carbonio sp_3 , ha permesso di ottenere un robusto network di legami idrogeno tra il gruppo ammidico e regione hinge. In particolare, ritroviamo la formazione di tre legami idrogeno; due con il residuo M793 e uno con L794 (**Figura 17F**). Nonostante la buona interazione con la tasca di legame, il gruppo ammidico interagisce anche con L732, presente nella regione esposta al solvente, sollevando dei dubbi sulla stabilità del posizionamento della molecola nella tasca. Per eliminare questa specifica interazione la propionammide è stata sostituita da un gruppo acrilammidico, ottenendo il composto FL30. Grazie al doppio legame presente tra il $C\alpha$ e il $C\beta$ dell'acrilammide si osserva un cambiamento nella

conformazione e nella lunghezza del legame, che ha come conseguenza la perdita dell'interazione con il residuo L732 senza alterare il legame della molecola alla regione hinge. La scelta del gruppo acrilammidico si è rivelata ottimale permettendo alla molecola di rispettare tutti i requisiti, mostrando anche un'affinità maggiore delle altre grazie alla presenza del doppio legame che va a posizionarsi ad una distanza ottimale con il sistema π $C_2=C_3$ dell'anello, e che permette la formazione di un'ulteriore interazione intramolecolare π - π (Figura 16).

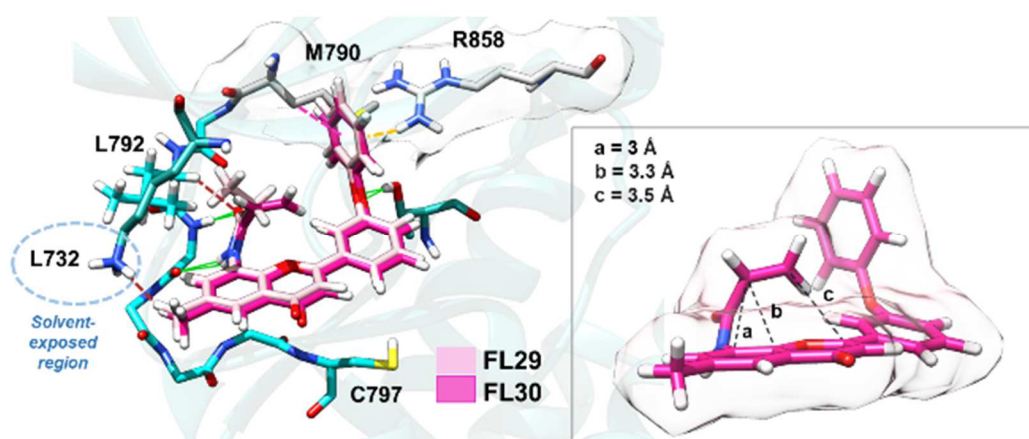


Figura 16. Sovrapposizione delle pose di binding di FL29 e FL30 con focus sulle interazioni intramolecolari mostrate da FL30

Al fine di valutare l'effetto della natura del gruppo elettrondonatore, legato al C6, sul binding del composto, il gruppo metile in C6 è stato sostituito con un gruppo $-OCH_3$. L'effetto di donazione elettronica sull'anello A è in questo caso maggiore, così come l'effetto sterico, avendo una dimensione maggiore. Nel composto FL31, contenente un gruppo acrilammidico in C8, questa sostituzione ha portato ad una modifica della forma e della polarità dell'anello A, determinando un'interazione con residui nella zona esposta al solvente e illustrando

l'importanza del gruppo metilico in posizione C6. Mantenendo il gruppo metilico, è stata tentata un'ultima sostituzione dell'acrilammide con gruppi ammidici più grandi come il pivaloile (FL32) o il benzammide (FL33), ottenendo il completo slittamento della molecola al di fuori della tasca di legame e confermando FL30 come uno dei composti più promettenti tra quelli individuati.

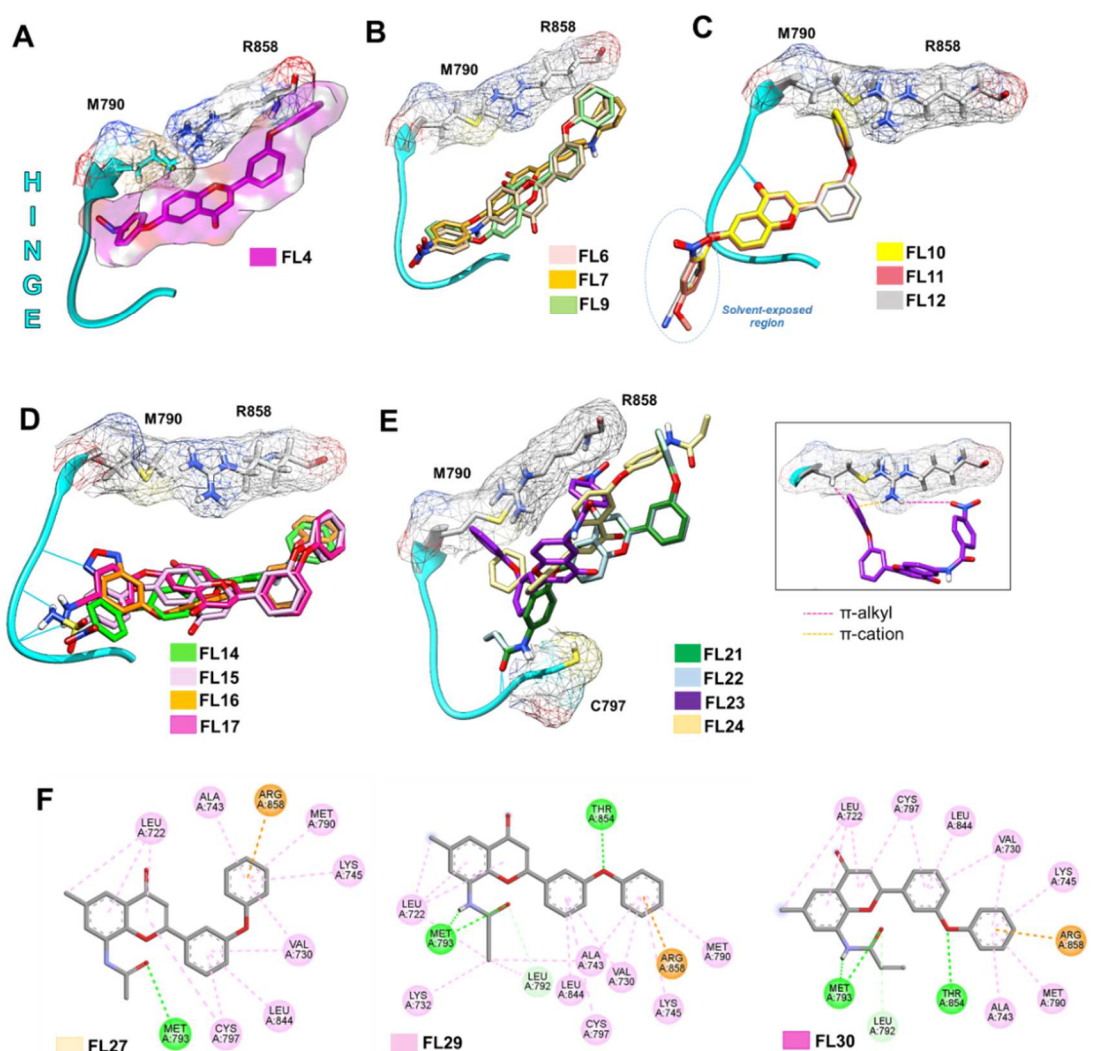


Figura 17. Docking di FL4 (A) e derivati (B-E) nella tasca di legame dell'ATP dell'LT-EGFR. In (E) sono riportate nel focus le interazioni specifiche di FL23 con M790 e R858. (F) modalità di binding dettagliata di FL27, FL29 e FL30

6.2 Sintesi di derivati di flavoni contenenti ammidi e valutazione della loro efficacia mutante-selettiva

6.2.1 Sintesi di derivati

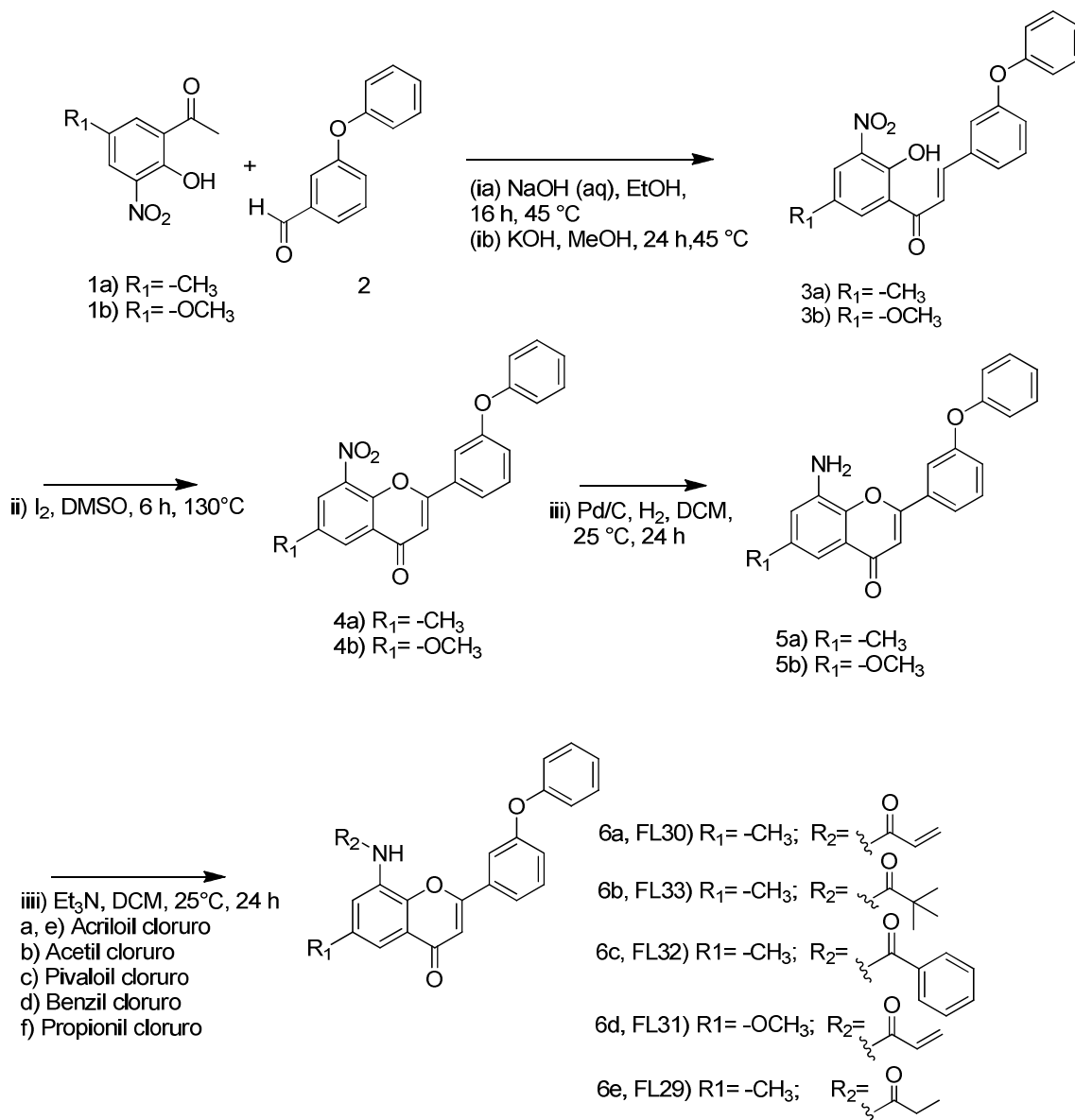
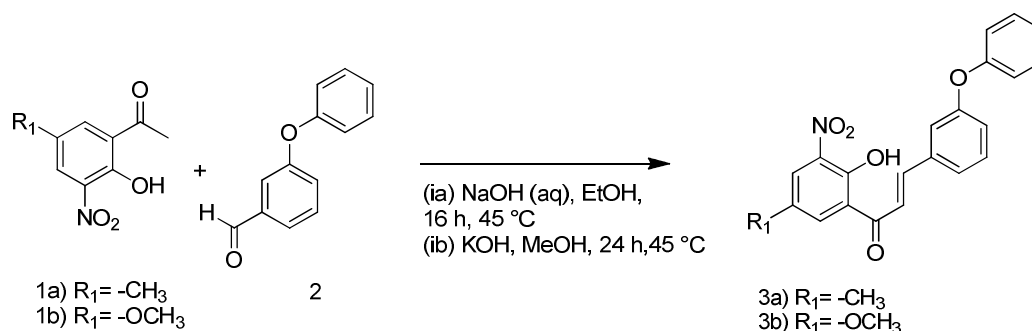


Figura 18. Procedura seguita per la sintesi dei composti FL29-FL33

I risultati ottenuti dagli studi *in silico* si sono rivelati particolarmente promettenti, soprattutto riguardo la molecola FL30, contenente il gruppo acrilammide. Per testare la validità dei risultati ottenuti con questo approccio sono stati sintetizzati tutti i flavoni contenenti gruppi ammidici in posizione C8 (FL29-FL33), includendo anche alcune molecole non rispondenti ai requisiti impostati da utilizzare come controlli interni della strategia computazionale utilizzata. La procedura di sintesi dei composti selezionati è descritta nella **figura 18**.

STEP 1: CONDENSAZIONE ALDOLICA



I composti 3a e 3b sono stati ottenuti tramite una reazione di Claisen-Schmidt, nota come reazione di condensazione aldolica incrociata, utilizzata per la sintesi di aldeidi o chetoni α,β -insaturi. Il meccanismo di reazione, illustrato sotto (**Figura 19**), prevede l'estrazione di uno degli idrogeni in α al carbonile di un chetone, formando un anione enolato stabilizzato per risonanza. Questo agisce da nucleofilo attaccando il carbonio carbonilico di un'aldeide aromatica e portando alla formazione del prodotto tramite una reazione di disidratazione.

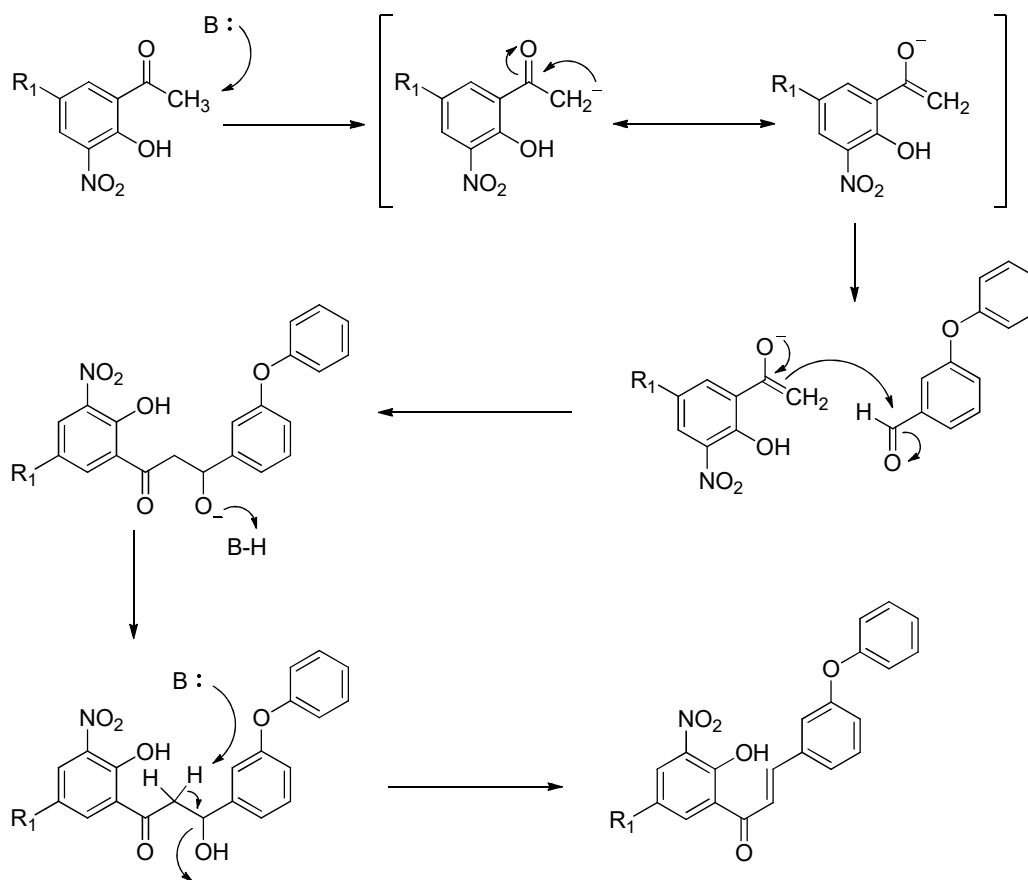
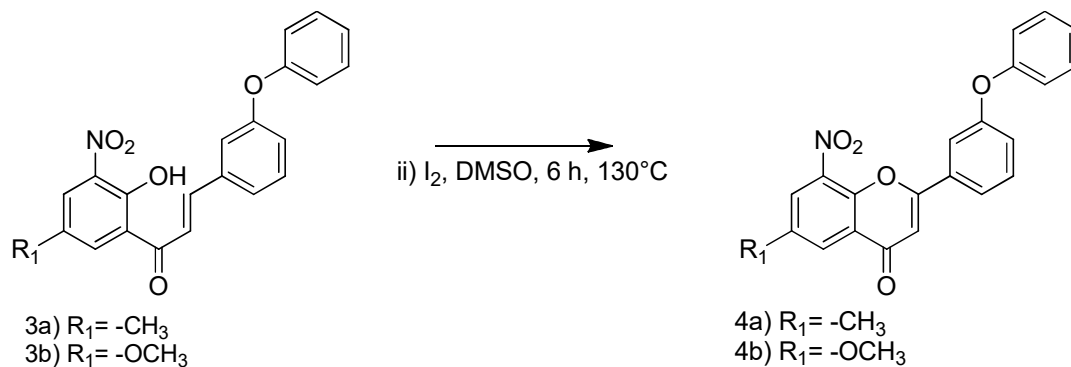


Figura 19. Meccanismo di reazione della condensazione aldolica incrociata per ottenere il composto 3a

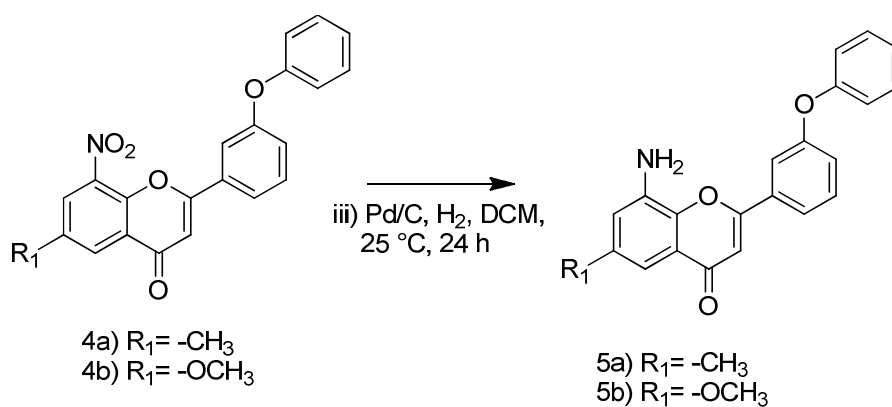
Nelle reazioni condotte è stata utilizzata come base una soluzione acquosa di idrossido di sodio (8 eq.), per ottenere il composto 3a, e una soluzione di idrossido di potassio (5.5 eq) in metanolo, per il composto 3b. A queste sono stati rispettivamente aggiunti i reagenti 1a e 1b (1 eq.). Dopo aver aggiunto 3-fenossibenzaldeide (1 eq.) le reazioni sono state mantenute in agitazione a 45 °C per 16 h e 24 h rispettivamente, andando poi a neutralizzare la base acidificando a pH 5-6 con una soluzione acquosa di HCl al 5%. Dopo estrazione con EtOAc e rimozione dei solventi i prodotti sono stati purificati mediante cromatografia su gel di silice.

STEP 2: CICLIZZAZIONE



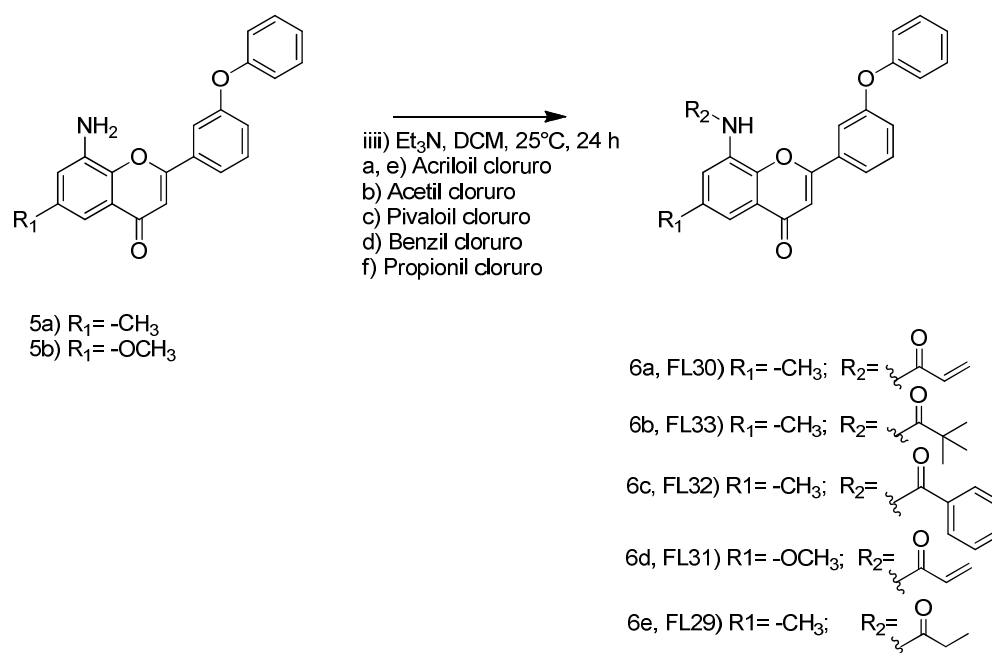
I composti ottenuti nello step 1 sono successivamente stati ciclizzati tramite una reazione catalizzata da iodio in DMSO. Ai composti 3a e 3b è stato aggiunto iodio molecolare, lasciando in agitazione a 130 °C per 6 ore. Dopo aver portato a temperatura ambiente, alla reazione è stata aggiunta una soluzione acquosa di tiosolfato di sodio, per ridurre lo iodio rimanente a ioduro, solubile in acqua. Dopo estrazione con CH₂Cl₂ e acqua i prodotti finali (4a, 4b) sono stati purificati tramite cromatografia su gel di silice.

STEP 3: NITRORIDUZIONE



I prodotti 5a e 5b sono stati ottenuti mediante una reazione di riduzione catalizzata da un sistema eterogeneo costituito da palladio su carbonio, utilizzando come agente riducente idrogeno gassoso pressurizzato, per ridurre selettivamente il gruppo nitro in gruppo ammino. Ai composti 4a e 4b, sciolti in CH₂Cl₂, è stato aggiunto palladio su carbone (Pd/C), mantenendo la reazione in agitazione a temperatura ambiente, in atmosfera di idrogeno, per 24 h. Il composto ottenuto è poi stato filtrato su carta da filtro per rimuovere il palladio e separato mediante cromatografia su gel di silice.

STEP 4: ACILAZIONE



Per ottenere i prodotti finali dello studio (FL29-FL33) sono state condotte delle acilazioni mediante un meccanismo di addizione nucleofila e successiva eliminazione (**Figura 20**). Il primo passaggio prevede l'attacco nucleofilo del gruppo ammino al carbonio carbonilico dell'acil-cloruro specifico. Successivamente il cloro, in quanto buon gruppo uscente, viene eliminato dall'intermedio formatosi, portando ai prodotti finali. Per tamponare l'HCl

formatosi dall'eliminazione del cloro, come base è stata utilizzata la trietilammina (Et_3N) in quanto, essendo ingombrata, non si comporta da buon nucleofilo e non va ad aggiungersi al cloruro presente come reagente.

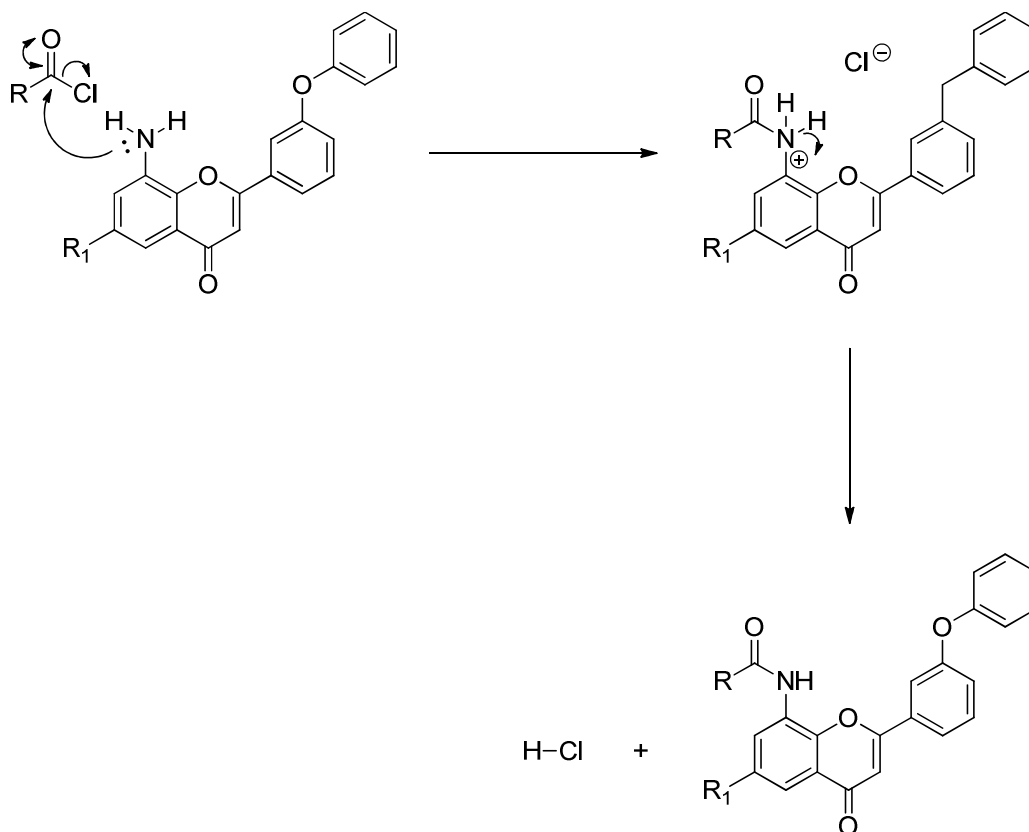


Figura 20. Meccanismo di reazione di addizione nucleofila ed eliminazione per ottenere i prodotti FL29-FL33

Al composto 5a, sciolto in CH_2Cl_2 , è stata aggiunta trietilammina (3 eq), raffreddando a 0°C . Successivamente, dopo l'aggiunta dell'acil-cloruro specifico (a-f), la reazione è stata portata a temperatura ambiente e lasciata in agitazione per tutta la notte. L'estrazione è stata condotta in CH_2Cl_2 ed il prodotto è stato poi purificato mediante cromatografia su gel di silice.

6.2.2 Valutazione dell'efficacia mediante saggio di inibizione enzimatica

I composti così sintetizzati sono successivamente stati testati mediante un saggio biochimico di inibizione enzimatica, in grado di determinare la capacità di inibizione della fosforilazione del recettore da parte delle diverse molecole sintetizzate e la selettività sul mutato rispetto al wild-type. Il saggio utilizzato si basa sull'utilizzo di uno specifico peptide substrato, incubato con l'EGFR in presenza di ATP (0.1 mM). In presenza di EGFR attivo il peptide viene fosforilato ed è possibile misurarne la fluorescenza, proporzionale alla sua concentrazione e quindi all'attività enzimatica, sia in presenza che in assenza degli inibitori sintetizzati. Per condurre una prima valutazione sull'attività dei composti nei confronti dell'LT-EGFR è stato eseguito un primo screening testando un'unica concentrazione delle diverse molecole (1 μ M). Lo scopo era infatti quello di ottenere analoghi di FL4 attivi a concentrazioni nanomolari. I risultati ottenuti sono mostrati nel grafico sottostante (**Figura 21**), e confrontati con un controllo negativo, condotto in assenza di inibitori.

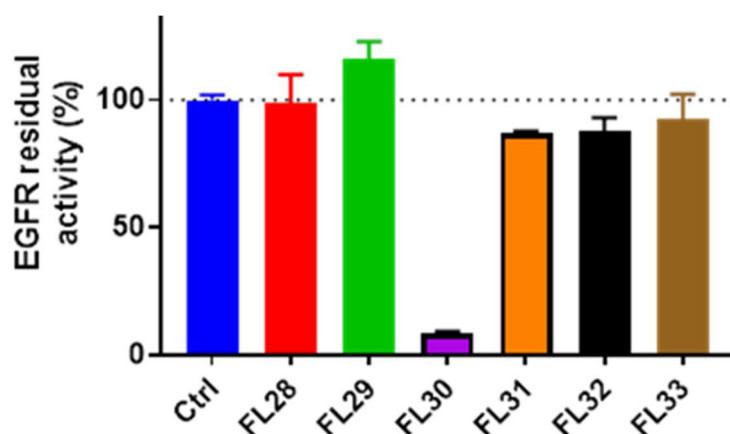


Figura 21. Attività residua di LT-EGFR in seguito a screening biochimico one-pot dei composti illustrati

Tra i composti testati, FL30, FL31 e FL32 hanno mostrato una certa attività inibitoria; tuttavia, i risultati migliori sono stati ottenuti con FL30. Come si vede dal grafico (**Figura 21**), a 1 μM , FL30 induce un'inibizione superiore al 90%.

Un secondo saggio dose-dipendente delle molecole, eseguito utilizzando concentrazioni da 0.03 μM a 10 μM , ha permesso di calcolare la concentrazione inibente (IC_{50}), ovvero la concentrazione di FL30 necessaria per inibire il 50% del bersaglio in esame. Per valutare l'attività inibente e la selettività dei composti sono stati utilizzati come standard Lapatinib ed Osimertinib: due inibitori tirosin-chinasici, specifici rispettivamente per la forma wild-type e per la forma mutata LT-EGFR. Nella tabella sottostante sono riportate le IC_{50} e l'indice di selettività, calcolato come rapporto tra l' IC_{50} dell'inibitore ottenuta nel wild-type e quella ottenuta nella forma di EGFR mutata.

Tabella 1. Valori di IC_{50} per EGFR wild-type e LT-EGFR

Composto	Attività chinasi (IC_{50} , nM)		Indice di selettività
	Wild type	L858R/T790M	
FL4	>150.000	12.000	>12.5
FL30	25.000	97	257
Lapatinib	5	12.000	-
Osimertinib	5.000	87	58

Come si può osservare dalla **tabella 1**, FL30 mostra un IC_{50} nei confronti di EGFR-LT di 97 nM, di poco più alto rispetto a quello dell'Osimertinib, attualmente utilizzato a livello clinico per il trattamento del NSCLC. I risultati sono particolarmente promettenti se si considera la sua scarsa efficacia nei confronti dell'EGFR wild-type, (IC_{50} , 25.000 nM). Questo determina

un indice di selettività pari a 257; 4 volte più elevato rispetto a quello mostrato dall'Osimertinib. Confrontando i risultati dell'FL30 con quelli del suo predecessore (FL4) si osserva un netto miglioramento dell'efficacia e della specificità nei confronti della forma mutata EGFR-LT, sottolineando nuovamente la validità dell'approccio di design razionale utilizzato.

6.3 Inibizione reversibile e competitiva di EGFR da parte di FL30: approfondimenti meccanici e sperimentali

In seguito agli studi eseguiti, FL30 si è rivelata una molecola estremamente efficace nell'inibire selettivamente LT-EGFR. Questa scoperta ha reso necessari ulteriori studi riguardo l'interazione della molecola con l'EGFR e lo specifico meccanismo di inibizione adottato. Nel dettaglio FL30 presenta un gruppo N-acriloile elettrofilo potenzialmente in grado di formare un legame covalente con il residuo C797 con conseguente inibizione irreversibile del recettore.

Il meccanismo di azione è stato quindi valutato mediante un approccio combinato sperimentale e computazionale. In particolare, dagli studi *in silico* condotti, il gruppo acriloile sembra posizionarsi nella tasca di legame dal lato opposto rispetto al residuo di cisteina, impedendo la formazione di un legame covalente. Al contrario, il legame della molecola all'interno del sito di legame dell'ATP lascerebbe piuttosto supporre un meccanismo di tipo reversibile e competitivo nei confronti dell'ATP.

Per verificare questa ipotesi sono state condotte delle analisi cinetiche, valutando eventuali variazioni della IC_{50} nei confronti dell'LT-EGFR in seguito ad un periodo di preincubazione di 45 minuti con FL30, testato a diverse concentrazioni. Gli inibitori reversibili tipicamente

raggiungono rapidamente l'equilibrio e rimangono in uno stato di binding reversibile con l'enzima, per questo motivo la presenza di un periodo di preincubazione prima dell'esecuzione del saggio biochimico non altera significativamente la IC_{50} osservata. Al contrario, l'inibizione irreversibile comporta una fase iniziale di legame guidata dall'affinità e un successivo step di inattivazione dell'enzima dipendente dal tempo. Durante il periodo di incubazione l'inibitore forma dei legami covalenti permanenti con l'enzima e dunque un periodo di preincubazione più lungo permette l'inattivazione di più molecole di enzima, richiedendo poi una concentrazione minore di inibitore per raggiungere il 50% di inibizione, e determinando quindi una diminuzione della IC_{50} in caso di preincubazione rispetto a quella ottenuta in assenza di questa.

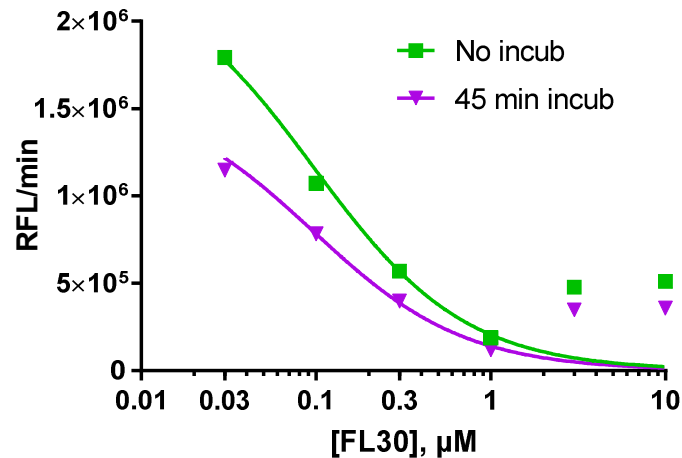


Figura 22. Misurazione dell'intensità di fluorescenza al variare della concentrazione di FL30, in presenza (verde) ed in assenza (viola) di un periodo di preincubazione

Dai risultati ottenuti dal saggio svolto, riportati in **figura 22**, non si notano variazioni sostanziali della IC_{50} in presenza o in assenza di un periodo di preincubazione con l'inibitore, risultato che risulta compatibile con la modalità di binding di un inibitore reversibile. Inoltre, aumentando la concentrazione di ATP da 0.1 mM a 1 mM l'attività inibitoria di FL30 risulta dimezzata, supportando l'ipotesi di una competizione con l'ATP per il legame al sito attivo.

6.4 Esperimenti cellulari e valutazione della percentuale di fosforilazione

Dopo aver constatato l'elevata efficacia di FL30 nell'inibire l'attivazione del recettore *in vitro*, sono stati condotti ulteriori esperimenti per valutare l'effetto della molecola in modelli cellulari. Le diverse molecole sono state testate su quattro diverse linee cellulari, delle quali tre tumorali ed una utilizzata come controllo:

- MCF7: linea cellulare di carcinoma mammario a bassa espressione di EGFR wild-type
- A549: linea cellulare di carcinoma polmonare NSCLC ad elevata espressione di EGFR wild-type
- H1975: linea cellulare di carcinoma polmonare NSCLC con LT-EGFR (L858R/T790M)
- HDF: fibroblasti del derma umani, utilizzati come controllo

L'attività citotossica dei composti è stata valutata tramite il saggio XTT, dopo un periodo di incubazione di 72 h con concentrazioni crescenti di inibitore. Nella tabella sottostante sono riportati i valori di IC_{50} ottenuti su FL30 per le diverse linee cellulari, confrontati con quelli di FL4 e dei due standard Lapatinib ed Erlotinib (Tabella 2).

Tabella 2. Valori di IC₅₀ per MCF7, A549, H1975 e HDF

	Citotossicità (IC ₅₀ , µM)				Indice di selettività
	MCF7 [a]	A549 [b]	H1975 [c]	HDF	
FL4	>100	>100	72 ± 4	>100	>1.4
FL30	60 ± 5	54 ± 3	4.7 ± 2	45 ± 3	13
Lapatinib	55	9	20	-	-
Erlotinib	4 ± 3	2.5 ± 0.4	62 ± 4	-	-

[a] bassa espressione di Wt-EGFR

[b] alta espressione di Wt-EGFR

[c] alta espressione di EGFR-L858R/T790M

Si osserva che la linea cellulare H1975, con EGFR doppio mutante (L858R/T790M), presenta nei confronti di FL30 un IC₅₀ di 4.7 µM (DS ± 2). Le linee cellulari con EGFR wild-type risultano invece più resistenti nei confronti della molecola, con IC₅₀ sensibilmente più alti e vicini al valore mostrato nelle HDF utilizzate come controllo. L'indice di selettività, ottenuto dal rapporto tra i valori di IC₅₀ misurati nelle A549 e quelli calcolati nelle H1975, risulta elevato e conferma la specificità dell'inibitore nei confronti dell'EGFR mutante rispetto alla forma wild-type. Inoltre, dal confronto con i valori ottenuti per il precursore FL4, si può osservare un netto miglioramento sia dell'attività inibente della molecola nei confronti dell'LT-EGFR, sia della sua selettività.

Come precedentemente visto, il composto FL30 e le altre molecole testate interagiscono con il recettore a livello della tasca di legame dell'ATP, competendo con questa ed impedendo l'autofosforilazione dei residui di tirosina presenti nel dominio N-terminale del recettore.

Per investigare ulteriormente la capacità inibente di FL30 nei confronti dell'EGFR mutante sono stati condotti degli studi per valutare l'entità della fosforilazione del recettore in presenza e in assenza di inibitore.

L'esperimento è stato condotto sulla linea NSCLC A549, con recettore wild-type, e H1975, con recettore L858R/T790M. La forma wild type EGFR richiede una pre-induzione dei livelli di fosforilazione del recettore, essendo esso attivato specificatamente in seguito ad interazione, a livello del dominio extracellulare, con i fattori di crescita. Per le A549, l'induzione della fosforilazione del recettore è stata quindi effettuata utilizzando EGF ricombinante, ligando naturale del recettore. La linea cellulare H1975 (EGFR-LT) non ha invece richiesto tale trattamento in quanto si tratta di una mutazione definita attivante, ovvero induce una attivazione costitutiva del recettore. Entrambe le linee cellulari sono state trattate con FL30 (1 μ M, 5 μ M) e FL4 (60 μ M). Per determinare il livello di fosforilazione del recettore, proporzionale alla sua attività, è stata effettuata una determinazione quantitativa mediante l'uso di anticorpi marcati diretti contro l'EGFR non fosforilato e fosforilato (Y1068). Le cellule così trattate sono poi state analizzate mediante citometria a flusso che ha permesso di calcolare la percentuale di fosforilazione dell'EGFR dividendo l'intensità di fluorescenza media dell'EGFR fosforilato per quella dell'EGFR non fosforilato.

Nel grafico sottostante (**Figura 23**) sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi dei livelli di fosforilazione della linea cellulare H1975, presentante la mutazione L858R/T790M. Nei confronti del trattamento con FL30 1 μ M e 5 μ M si osserva una diminuzione della fosforilazione della Tyr1068 rispetto al controllo negativo ed anche rispetto ad i risultati ottenuti dal trattamento con FL4.

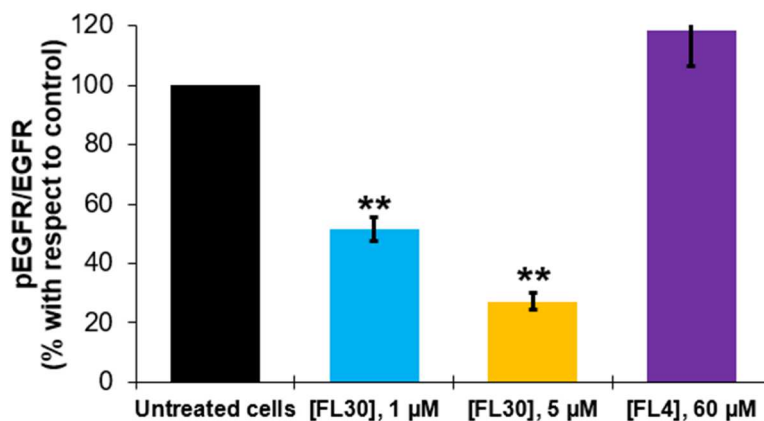
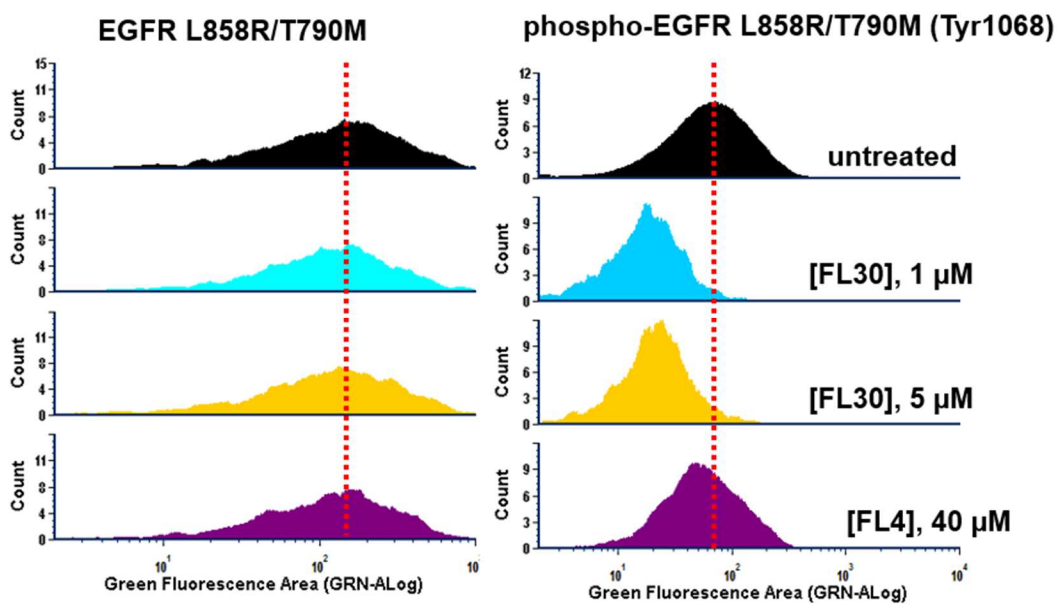


Figura 23. In alto, intensità di fluorescenza misurata per LT-EGFR (sinistra) e LT-EGFR fosforilato (destra) in seguito a trattamento con FL30 1 μM (azzurro), FL30 5 μM (giallo), FL4 40 μM (viola) e controllo (nero). In basso, percentuale di fosforilazione dell'EGFR rispetto al controllo (nero) in seguito al trattamento con FL30 1 mM (azzurro), FL30 5 mM (giallo) e FL4 60 mM (viola)

In particolare, si osserva una netta diminuzione della fosforilazione in seguito al trattamento con FL30 di circa il 40% ed 80% ad 1 μM e 5 μM , rispettivamente. Il composto FL4, nonostante l'elevata concentrazione, non porta ad una sensibile riduzione dell'attività del recettore.

Gli stessi esperimenti sono stati condotti sulla linea cellulare A549, con EGFR wild-type, per poter valutare la selettività della molecola. Come si osserva dal grafico in **figura 24**, in questo caso non sono state registrate delle variazioni sostanziali nella fosforilazione del recettore rispetto al controllo: la percentuale di fosforilazione, riportata nell'istogramma, resta infatti pari al 100% in seguito al trattamento con FL30 1 μM e, anche aumentando la concentrazione a 5 μM rimane comunque molto elevata, attestandosi intorno al 90%. Questi risultati confermano dunque l'elevata selettività della molecola, in grado di agire inibendo la fosforilazione, e quindi l'attivazione, del recettore mutato, senza andare ad alterare il normale funzionamento del wild-type.

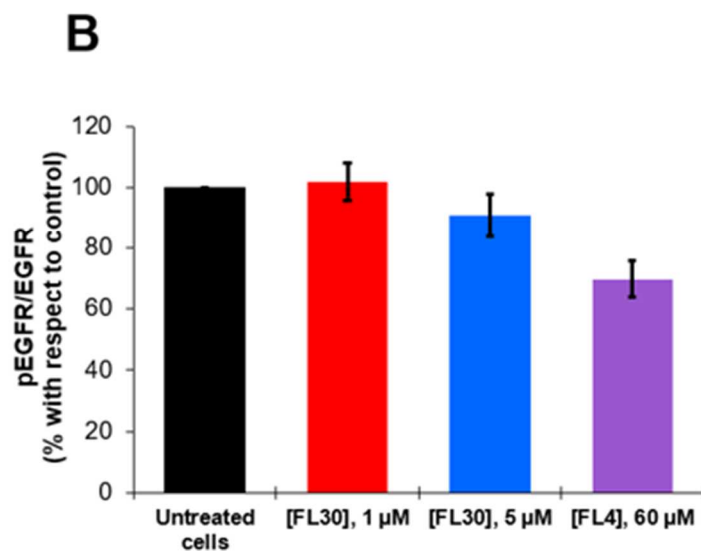
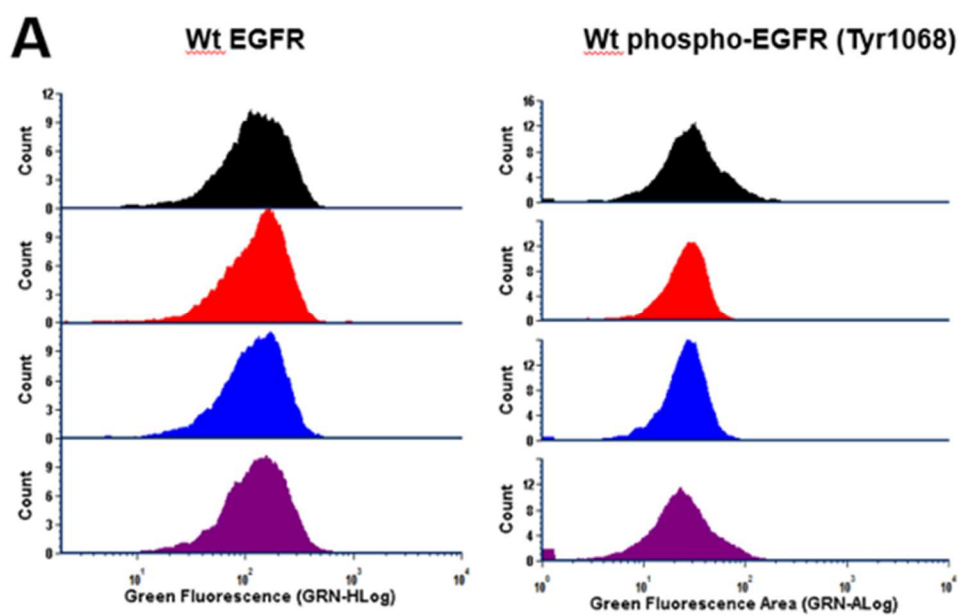


Figura 24. (A) Intensità di fluorescenza misurata per WT-EGFR (sinistra) e WT-EGFR fosforilato (destra) in seguito a trattamento con FL30 1 μ M (azzurro), FL30 5 μ M (giallo), FL4 40 μ M (viola) e controllo (nero). (B) Percentuale di fosforilazione dell'EGFR rispetto al controllo (nero) in seguito al trattamento con FL30 1 mM (azzurro), FL30 5 mM (giallo) e FL4 60 mM (viola)

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

L'obiettivo su cui si basa la ricerca effettuata è l'identificazione di un nuovo TKI reversibile e selettivo nei confronti dell'LT-EGFR. Al termine degli studi eseguiti FL30 si è dimostrato un composto estremamente promettente, efficace a concentrazioni nanomolari e in grado di agire selettivamente sulla forma mutata, andando a confermare la validità dell'approccio di design razionale *in silico* utilizzato per giungere alla molecola. Gli ottimi risultati ottenuti sia *in vitro* che nei test cellulari hanno inoltre aperto la strada a molte prospettive. Uno dei principali obiettivi futuri riguarderà la valutazione della stabilità metabolica del composto, che si qualifica anche come ottimo punto di partenza per l'introduzione di ulteriori modifiche strutturali mirate ad ottenere un nuovo inibitore ancora più performante di FL30 in termini di efficacia e selettività. Inoltre, un'altra interessante prospettiva futura riguarderebbe la possibilità di eseguire test *in vivo* della molecola per constatare se le ottime potenzialità riscontrate *in vitro* si confermino anche in un contesto biologico più complesso.

BIBLIOGRAFIA

- [1] P. Wee e Z. Wang, «Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways», 17 maggio 2017, *MDPI AG*. doi: 10.3390/cancers9050052.
- [2] E. Laudadio, L. Mangano, e C. Minnelli, «Chemical Scaffolds for the Clinical Development of Mutant-Selective and Reversible Fourth-Generation EGFR-TKIs in NSCLC», 19 aprile 2024, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acscchembio.4c00028.
- [3] Y. Huang *et al.*, «A molecular mechanism for the generation of ligand-dependent differential outputs by the epidermal growth factor receptor», doi: 10.7554/eLife.
- [4] «3 c-Abl Tyrosine Kinase and Inhibition by the Cancer Drug Imatinib (Gleevec/STI-571)».
- [5] N. E. Hynes e H. A. Lane, «ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors», maggio 2005. doi: 10.1038/nrc1609.
- [6] C. Minnelli, E. Laudadio, G. Mobbili, e R. Galeazzi, «Conformational insight on WT- and mutated-EGFR receptor activation and inhibition by epigallocatechin-3-gallate: Over a rational basis for the design of selective non-small-cell lung anticancer agents», *Int J Mol Sci*, vol. 21, n. 5, mar. 2020, doi: 10.3390/ijms21051721.
- [7] N. Normanno *et al.*, «Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer», 17 gennaio 2006. doi: 10.1016/j.gene.2005.10.018.

- [8] C. Minnelli, L. Cianfruglia, E. Laudadio, M. Giovanna, R. Galeazzi, e T. Armeni, «Effect of epigallocatechin-3-gallate on egfr signaling and migration in non-small cell lung cancer», *Int J Mol Sci*, vol. 22, n. 21, nov. 2021, doi: 10.3390/ijms222111833.
- [9] N. Shaban, D. Kamashev, A. Emelianova, e A. Buzdin, «Targeted Inhibitors of EGFR: Structure, Biology, Biomarkers, and Clinical Applications», 1 gennaio 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/cells13010047.
- [10] B. Rude Voldborg, L. Damstrup, M. Spang-Thomsen, e H. Skovgaard Poulsen, «Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials», dicembre 1997. doi: 10.1023/A:1008209720526.
- [11] G. Caldieri, M. G. Malabarba, P. P. Di Fiore, e S. Sigismund, «EGFR Trafficking in Physiology and Cancer», 1 gennaio 2018, *NLM (Medline)*. doi: 10.1007/978-3-319-96704-2_9.
- [12] A. F. Gazdar, «Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: Role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors», 2009. doi: 10.1038/onc.2009.198.
- [13] G. Da Cunha Santos, F. A. Shepherd, e M. S. Tsao, «EGFR mutations and lung cancer», *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, vol. 6, pagg. 49–69, feb. 2011, doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130206.
- [14] T. Zubair e D. Bandyopadhyay, «Small Molecule EGFR Inhibitors as Anti-Cancer Agents: Discovery, Mechanisms of Action, and Opportunities», 1 febbraio 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/ijms24032651.

- [15] C. O’Leary *et al.*, «Epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated non-small-cell lung cancer (NSCLC)», *Pharmaceuticals*, vol. 13, n. 10, pagg. 1–16, ott. 2020, doi: 10.3390/ph13100273.
- [16] A. Leonetti, S. Sharma, R. Minari, P. Perego, E. Giovannetti, e M. Tiseo, «Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer», 29 ottobre 2019, *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/s41416-019-0573-8.
- [17] T. Amelia, R. E. Kartasasmita, T. Ohwada, e D. H. Tjahjono, «Structural Insight and Development of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors», 1 febbraio 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/molecules27030819.
- [18] S. Wang, Y. Song, e D. Liu, «EAI045: The fourth-generation EGFR inhibitor overcoming T790M and C797S resistance», 28 gennaio 2017, *Elsevier Ireland Ltd*. doi: 10.1016/j.canlet.2016.11.008.
- [19] M. Singh, M. Kaur, e O. Silakari, «Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry», 12 settembre 2014, *Elsevier Masson SAS*. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.07.013.
- [20] C. Minnelli *et al.*, «Identification of a novel nitroflavone-based scaffold for designing mutant-selective EGFR tyrosine kinase inhibitors targeting T790M and C797S resistance in advanced NSCLC», *Bioorg Chem*, vol. 129, dic. 2022, doi: 10.1016/j.bioorg.2022.106219.
- [21] N. W. Roehm, G. H. Rodgers, S. M. Hatfield, e A. L. Glasebrook, «An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT», 1991.

- [22] Y. Ding e X. Xue, «Medicinal Chemistry Strategies for the Modification of Bioactive Natural Products», 1 febbraio 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/molecules29030689.
- [23] S. Kumari, A. V. Carmona, A. K. Tiwari, e P. C. Trippier, «Amide Bond Bioisosteres: Strategies, Synthesis, and Successes», 12 novembre 2020, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00530.
- [24] H. M. Patel, R. Pawara, e S. J. Surana, «Discovery of Fourth-Generation Allosteric C797S Inhibitors», in *Third Generation EGFR Inhibitors*, Elsevier, 2019, pagg. 173–177. doi: 10.1016/b978-0-08-102661-8.00006-8.